



TITLE:

ロドプシンの第1光産物についての研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

七田, 芳則

CITATION:

七田, 芳則. ロドプシンの第1光産物についての研究. 京都大学, 1979, 理学博士

ISSUE DATE:

1979-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2169>

RIGHT:

學位申請論文

七田芽則

理
301 函
1-6

学位申請論文

ロドアシノのオノ先産物にツヒエの所成

京都大学大学院理学部数学科

生物物理學専攻

七田 芳則

目 次

ページ

I 序 論

1.

II 材料と方法

1) 実験材料.	11
2) マイクロボライの分離と ロドファシンの抽出.	11
3) 低湿吸収スペクトルの測定.	17
4) アイスロドファシンの調製.	20
5) ココ秒レーザ スペクトロメータ.	23
6) ナノ秒レーザ スペクトロメータ.	29
7) 使用した薬品.	31

III 結 果

IV - 1, <u>液体ヘリウム温度での ロドファシンの光反応.</u>	32
---	----

1) イカロドグロシンの吸収
スペクトルの温度変化。 32

2) 液体ヘリウム温度でのセグソ
ロドグロシンの生成、及び、
セグソロドグロシンの光反応。 34

Ⅲ - 2, セグソロドグロシン, バソ
ロドグロシンの, マイクロビライ
ズの生成。 57

Ⅲ - 3, ロドグロシンのレーザー
ホトリリス。 61

1) 液体ヘリウム温度で, ロドグ
ロシンを 347nm の連続光で照射
したときのスペクトル変化。 62

2) 常温, 及び, 液体窒素温度で,
ロドグロシンをピコ秒パルスで
励起した後のスペクトル変化。 64

3) 常温でロドグロシンをナノ秒パ
ルスで励起した後のスペクトル

ル変化。

73

4) イカロドプシンの光吸収後の
反応過程。

73

IV 考 察

IV - 1, ヒプロロドプシンの
発色団の構造。

77

IV - 2, 液体ヘリウム温度での
バソロドプシンの生成について。

82

IV - 3, ウシロドプシンとイカロ
ドプシンの初期反応の違い。

88

IV - 4, ロドプシンの光吸収後の
構造変化について

93

V 要 約

100

VI : 謝 辞

103

f

VI 文 献

104

1 序 論

ロドプシンは、11-シス型レタナール₂ (ロ
タミノ A₁ のフォルデヒド型) を発色団として持
つ疎水性の膜タンパク質である。可視部に発
色団に由来する広範囲な吸収帯を持つとい
ふ。ヒトの暗明視感度曲線は、この可視部の
吸収スペクトルと一致するから¹⁾、ロドプシン
が視覚の明暗に関係した光受容物質(視物質)
であることは間違いない。視覚の初期過程で
興味ある所原は、(1)視物質ロドプシンが光を
吸収した後、最初によりどのような構造変化を起
こすのか。(2)どのような構造変化がどのような過程
で視細胞の電気生理的なポテンシャル変化を
導き出すのかである。本所原は上記2つの
うち、前者のテーマに就いて行なわれた所原
である。視覚において、光量子は、動物の視
覚器官に蓄えられているエネルギーを一度
に放出させるトリガーとして働いている。

したから、動物が光エネルギーを感覚情報として、どのような利用しているかを分るレベルで明らかにしようとするなら、まず、ロドプシンが光を吸収することによって、どのような構造変化を起こすのかを明らかにしなければならぬ。実験的には、ロドプシンの光分解産物、及び、初期中間体か、どのような性質を持つものなるかを明らかにすることである。以下、本研究所に関連したロドプシンの性質について概説する。

脊椎動物のロドプシンは、網膜の杆状視細胞の外節と呼ばれる部分に存在している円板膜の中に局在している。これに対し、脊椎動物の眼と同様、高度に進化したカメウズ眼を持つカメ、タコなど、軟体動物のロドプシンは、視細胞外節の形質膜が変形して、外節の長軸と直角方向に突出した小管構造（メンクローライ²⁾）の膜中に存在している（図1）。ロドプシンは、疎水性のタンパク質であるから、

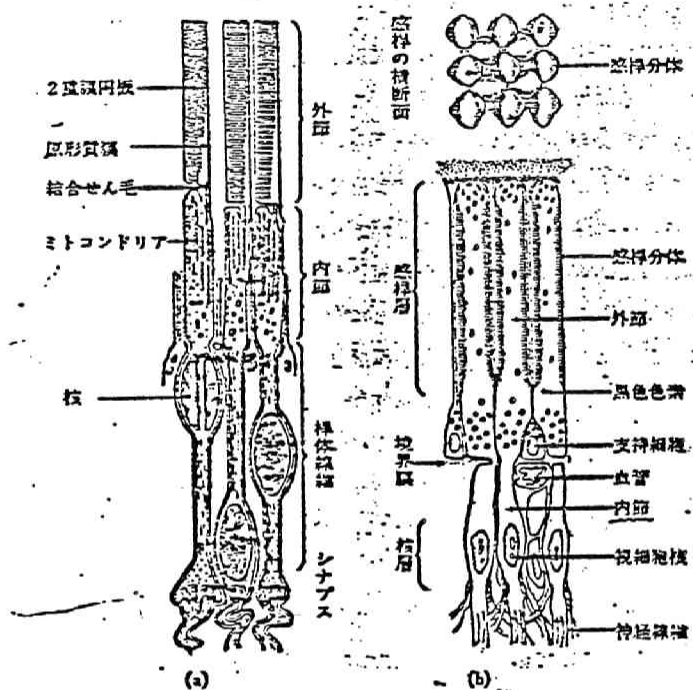


図 1、モルモットの桿体 (a) と、
タコの網膜 (b) の模式図。

(Sjöstrand (1959)³⁾ と田崎 (1967)⁴⁾ から改変)。

多くの所から、界面活性剤（ジギトニン、
Ammonyx LO など）で抽出された試料にっいて行
なわれてゐる。

ロドプシンの存在している視細胞が光を食
害して、膜のイオン透過性を変え、電気の存
シグナルを出すのに、わずか数ミリ秒しかか
からない⁵⁾。これは、視興奮に関して、ロドプ
シンの果たす役目が、数ミリ秒で終る、としま
うことを示してゐる。従来、このような速い
過程と虚想で研究するのには難かしか、たのど、
ロドプシンも分析可能なことにあり反応速度も
遅らえて、低温吸収スペクトル的に研究されて
きた⁶⁾。この結果、ロドプシンが光を吸収する
ことにあり、吸収スペクトル的に区別される
多種多様な中間が並び、最終産物へと変化する
ことがわかった。このロドプシンで行なわれて
た研究の結果を示すと、図2のようになる^{2,6)}。

本研究は、この図の初期の反応に關係した
ものである。従来ロドプシンが光を吸収する
と、バソロドプシンという名で呼ばれる中間

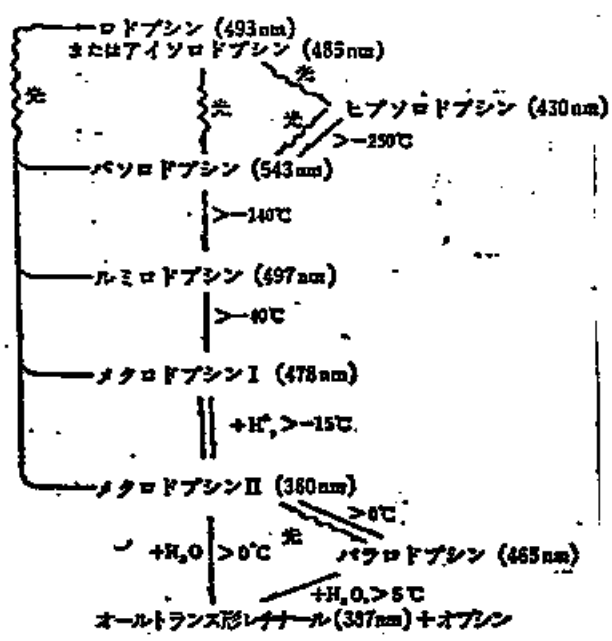


図 2, ウシロドプシンの退色過程⁶⁾

直線で示されているのは、熱反応、
 波線で示されているのは 光反応。
 括弧内に示されているのは λ_{max}
 直線の右側の数字は、その温度以上
 で反応が進行可能であることを示している。

体（中間状態）に変化すると考えらるゝきた。
 この中間体は危前か示すやうに、ロドプシン
 よりも長波長に吸収極大を持つ（バソクロミ
 ックシフト）。最初、ウシロドプシンのジギ
 ト＝ノ抽出液を液体窒素中（88K）で光照射
 することにより発見された⁷⁾。その後、種々の
 動物のロドプシンを液体窒素温度（77K）で
 光照射しても生成すること⁸⁾、また網膜中でも
 生成すること⁹⁾が示された。さらに、レーザ
 フォトリシスにより、室温でも生成すること
 が^{10~12)}見い出されて、生理的に重要な中間体であ
 ることが確かめられた。

しかし、数年前、吉澤と堀内は^{6), 13)}、ウシロド
 プシンを液体ヘリウム温度（4K）で黄色光
 で照射すると、ロドプシンより吸収極大が短
 波長にある光産物が¹¹⁾生成することを見つけた。
 るして、この光産物をヒメロドプシンと命
 名した。ヒメロドプシンは、24K以上の温
 度でバソロドプシンに変化することから、バソ
 ロドプシンよりも先に生じる中間体であるやう

と推察された。しかし、ロドプシノを琥珀ヘリウム温度で青色光で照射すると、バソロドプシノが生成し、ヒアソロドプシノは全然生成しなかった。また、ヒアソロドプシノの生成の量子収率は、バソロドプシンのそれに比べて非常に小さく、ヒアソロドプシンを光照射すると、バソロドプシンに変化した。このように、ヒアソロドプシンは、ロドプシンの生理的は中間体というより、琥珀ヘリウム温度における、ロドプシンの副光産物のような性質を示した。Wald⁽¹⁴⁾は、ヒアソロドプシンは、ロドプシンの副光産物である。つまり、バソロドプシンから生成する光産物、かも知れないと考えた。

さて、従来視覚の初期過程は、ロドプシンの発色団レチナール¹⁾の、光によるシス-トランス異性化に、⁽¹⁵⁾と始まると考えられてきた。この根拠の主なものは、1) ロドプシンの発色団は11-シスレチナールであるが、光退色産物は、オールトランスレチナールとタンパク

質オプシンである。2) 遮離のハリススレタナールは、先にト、エ、オールトランススレタナールに異性化される。3) ロドプシンのオ1光産物と考えられたバソロドプシンは、ロドプシンより長波長に吸収極大を持ち、分子吸収係数が大きい。バソロドプシンの吸収特性は、バソロドプシンの発色固相、歪んだオールトランススレタナールであると考えるれば説明できることから言われていた。

しかし、最近、ビュセカンドレーザを用いた実験から、常温でのウシバソロドプシンの生成が、ロドプシン光吸収後、6 μ s秒以内という、非常に短い時間内で起こることや、¹⁰⁾ 中間体生成速度にライソトピー効果が見られることなどが報告され、¹⁶⁾ 視覚の初期過程のハリストランス異性化説に疑問が投げかけられている。さらに、ロドプシンの発色は、もし、この光産物がロドプシンの中間体であるなら、吸収スパクトルを説明するために、単純なハリストランス異性化以外のメ

メカニズムを考へる必要が長じてくる。

以上のことか、視覚の初期過程、特に、ロドプシンの光反応初期過程のメカニズムを考へる上で、ヒグソロドプシンの役割は重大で、それが、生理的な中間体であるかどうかを決定することは重要であると考へた。もし、ヒグソロドプシンが生理的に重要な中間体であれば、次の条件を満たしているはずである。

- i) 種々の動物のロドプシンから生成する。
- ii) 網膜中にありいは、視細胞外節の懸濁液)で生成する。
- iii) 生理的溫度で生成する。

上記の可能性を検討するため、本研究では、頭足類のメカのロドプシンについて、ヒグソロドプシンが生成^りするか、また、もし生成するのなら、生理的溫度でも生成する中間体なりかが調べられた。

結果の項Ⅲ-1には、メカロドプシンでも、ロドプシンと同様、液体ヘリウム溫度で、

黄色光照射すると、ロソロドアシンが生成すること、及び、イカロドアシン系が液体ヘリウム温度での光反応がまとめられている。

結果の項Ⅲ-2には、ロソロドアシンが視細胞外節（マイクロビライ）の懸濁液でも生成することから示されている。

さらに、結果の項Ⅲ-3には、ロコセカンドレーガーフォトリシスを室温、及び、液体窒素温度で行なうことにより、生理的溫度でロソロドアシンが生成すること、及び、ロソロドアシンが、ロロドアシンの前駆体である（ロドアシンの主要光産物はロソロドアシンである）ことがまとめられている。

以上の結果をもとにして、ロドアシンの光反応初期過程のメカニズムの1つのモデルが、表の項で議論されている。

II 材料と方法

1) 実験材料

日本海産のスルメイカ (Todarodes pacificus) を用いた。

兵庫県城崎郡香住町の竹野漁業組合の好意により、スルメイカから、夜明け前うちに眼球を採集し、アイスボックスに入れて所産度を持ち帰った。眼球は、ロドプシンと抽出するまで、 -20°C で保存した。

以下のすべての操作は、ロドプシンが光退色しないように、ロドプシンの吸収しない、暗赤色光のもとで行われた。

2) マイクロピラインの分離とロドプシンの抽出

イカ、網膜には、2つの感光色素があることが報告されている。(1) 1つはロドプシン、他の1つはレトリウムである⁽¹⁷⁾。本研究所では、Hubbard and St. George (1954)⁽¹⁸⁾ に従って報告を

れをいりる方法を改良することになり、2, 4
ノクロム、の混在、なら、クロム、の抽出液を調
製した。1回の操作で、眼球60~100コを処理
した。

-20℃で凍、えいりる眼球を、室温で除きと
かし、ハサミを使い、赤道面を切開した。次
に、網膜側の半球を、約50mlの0.1Mリン酸緩
衝液($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8, 以下、①-緩
衝液と略す)中で静かに振り、クロム、を
含む視細胞外節を、網膜からはずし、緩衝液
中に遊離させた。得られた懸濁液を、2枚重
ねのガーゼで濾過し、操作中にはいった。し
たが、その他の大いなる残渣を取り除いた。

懸濁液に、等量の80%ショ糖溶液(w/v)を
加え、よく攪拌したのち、ショ糖密度遠心分
離($10,000 \times g$, 30分)を行なった。視細胞外節
は、この操作で、上部に集り、た。この上清
に3倍量の①-緩衝液を加え、よく攪拌した
のち、遠心分離($10,000 \times g$, 1時間)し、視細胞
外節と、沈殿物として集めた。

得られた視細胞外節を、38% ショ糖 (w/v) - 0.1 M リン酸緩衝液に懸濁し、再度、ショ糖密度遠心分離を行なった。次に、上清に3倍量の④-緩衝液を加え、遠心分離 ($10,000 \times g$ 1時間) し、視細胞外節を沈殿物として集めた。さらに、この操作をもう一度繰り返した。

この下層に12得られた沈殿物を、④-緩衝液、蒸留水、0.1 M 炭酸緩衝液 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ pH 10.0)、蒸留水で、順次、懸濁し、遠心する ($14,000 \times g$ 40分) により、沈殿物から、水溶性のタンパク質、遮蔽色素 (screening pigment) であるオモクリン、その他を洗い出した。この洗浄操作を、5回繰り返した。

最後の遠心操作により、2得られた沈殿物は、2層に分かれていた。上層は、暗赤色光のもとで半透明に見える、ロドプシンを含む感杆の膜画 (マイクロソーム) であり、下層は暗赤色光のもとで黒く見える、視細胞外節のコア基質である。

この沈殿物の上層のマイクロソーム画を

有離するたため、以下の遠心操作を行なうた。
 沈殿を④-緩衝液に懸濁し、 $10,000 \times g$ で30分遠心した。この遠心操作では、下層は完全に沈殿するが、上層は沈殿が不完全であった。上清の約 $\frac{2}{3}$ をピペットで取り、その後、遠心管を2~3度静かに振ることにし、上層を残りの上清に懸濁し、この上清をピペットで集めた。得られた懸濁液を、 $25,000 \times g$ で1時間遠心することにし、マイクロロームを沈殿として集めた。

最後に、この沈殿物から、マイクロームを完全に除くため、 $0.1M$ 炭酸緩衝液(pH 10.0)で3回、その後、蒸留水で3回洗浄した。

本実験の後期には、マイクロローム分画の有離を、ショ糖線型密度勾配法(25%~40%
 $\% , 105,000 \times g , 8 \text{ 時間}$)で行なうた。マイクロローム分画は、この操作で、他の分画と完全に有離した。

ロドプシンは、このマイクロローム分画から2%・ジギトニン- $0.1M$ 炭酸緩衝液(pH 10.5)

で抽出された。マウクロビライ分画に上記の
液 5 ml を加え、よく攪拌したのち、4°C で
2 時間 ~ 10 時間放置後、遠心 ($15,000 \times g$ 30
分) し、ロドプシン抽出液を得た。この抽出
操作は、合計 3 回行なう。た。

最初の抽出操作で、光学純度 (A_{390nm}/A_{480nm}) =
0.26 ~ 0.31, $A_{480nm} = 3.0 \sim 6.0$ のロドプシン抽
出液が得られた。

抽出液にレタノクロムが混在する可能性は、
以下に示すように確かめられた。少量の抽
出液を 5 倍量の①-緩衝液で希釈し、総濃度
0.1 M になるよう、1 M ヒドロキシルアミン溶
液 (pH 6.5) を加え、480 nm の吸光度変化を
測定した。レタノクロムはロドプシンと同
様 480 nm 付近に吸収を持つが、ヒドロキシル
アミンに耐えず不安定で退色する⁽¹⁴⁾。ロドプ
シンは安定である。したがって、抽出液にレ
タノクロムが混在しておれば、480 nm の吸光度
は減少するはずである。測定結果は、希釈効
果以外の吸光度の減少はみられなかった。し

たが、こゝに抽出液にレタノウム混合のな
いことが確かめられた。

液体ヘリウム温度、及び、液体窒素温度で
実験する場合、試料も透明に凍らせるため、
クロロホルム抽出液、あるいは、メタノール
に、2倍量のグリセリンを加えた。ま
た、濃度の高い試料を得たいときには、試料
を 105,000 $\times g$ で 12 時間 ~ 16 時間、超遠心す
ることにより、2 濃縮した。

上記の遠心操作には、日立製 55P-2 型超遠
心機、及び、Tomy Seiko 製 RS-71 型冷凍遠心機
を使用した。

3) 低温吸収スペクトルの測定

本実験で使用された、低温吸収スペクトル測定用リデュワーが図3に示されている。これは一種の二重真空の魔法瓶で、内側に液体ハリウムを充填し、外側に液体窒素を充填するようになつてゐる。試料のほうは、たセルホルダーは、液体ハリウムを充填する部分と無酸素銅でつながつており、伝導により、試料の温度を下げるようになつてゐる。試料を充填する吸収セルは、測定先に沿つて、石英板、シリコンゴムリング（内径 9 mm 、厚さ $2\text{ mm} \sim 4\text{ mm}$ ）、オパールガラスからなり、試料は、石英板とオパールガラスで挟まれたシリコンリングの中に充填した。充填の際、試料を冷却して粘度を上げ、気泡がはいらないように注意した。試料の温度は、金-クロメル熱電対を、シリコンホルダーに固定して測定した。

吸収スペクトルは、日立製、323 型分光光度計で測定された。

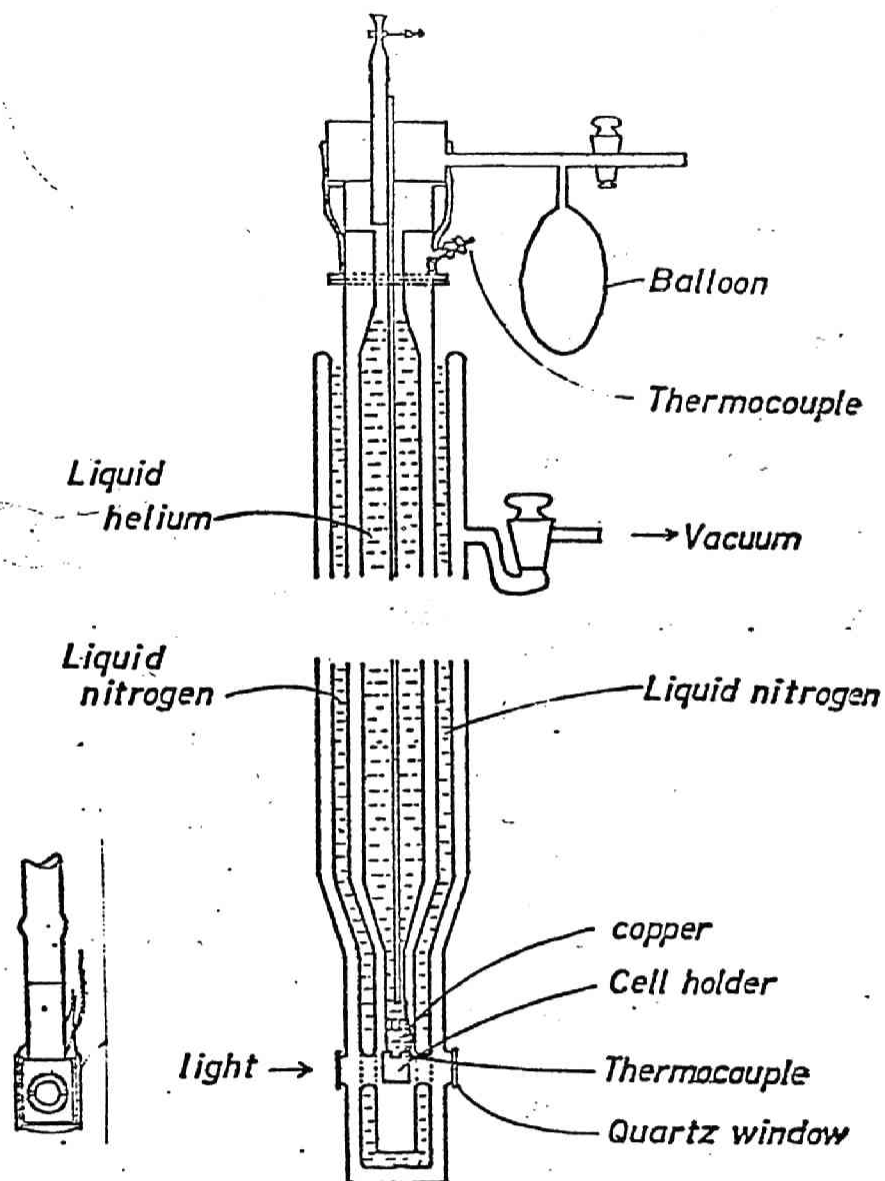


図 3 液体ヘリウム温度用、
測定デューワ

左下の図は、吸収セルの部分を
拡大したものである。

試料を照射するための光源として、2 kWの
オセノシラノブ（オシオ製）を使用した。ま
た、照射波長の選択は、干渉フィルターとカ
ットオフフィルター（ともに東芝製）を組み
合わせて行うた。

4) アイソロドプシンの調製

アイソロドプシンは、吉澤とWaldの方法¹⁹⁾に従って調製した。

ジギトニン抽出したロドプシンとグリセロールの混合液(1、2)を、液体窒素温度まで冷やし、560nm以上の光で6時間照射した。この照射により、ロドプシンは、ほとんど、アイソロドプシンに変化した。少量は、バソロドプシンに変化した。バソロドプシンを除去するためさらに610nm以上の光で1時間照射した。このようにして調製した試料には、95%以上のアイソロドプシンが含まれていた。混合物中のロドプシンとアイソロドプシンの量比は以下の方法を用いて決定した。¹⁹⁾

照射した試料を15°Cまで温め、この温度で580nm以上の光を照射し、490nm(ロドプシンとアイソロドプシンの等吸収点)の吸収の減少を照射時間に対して片対数で目もった。ロドプシン、及び、アイソロドプシンは、この温度で光照射されると、アルカリメタロドプ

シシに変化するが、ロドポシシのほうに変化速度が、かなり速い。したがって、二片対数プロットは途中で折れ曲がる。初期の傾きの急な部分は、主にロドポシシが変化した部分で、後のゆるやかな部分は、アインソロドポシシの変化に由来する。後の直線部分を $t=0$ に外挿すれば、その値が混合物中のアインソロドポシシの量比を与える。典型的な実験のグラフを図4に示した。

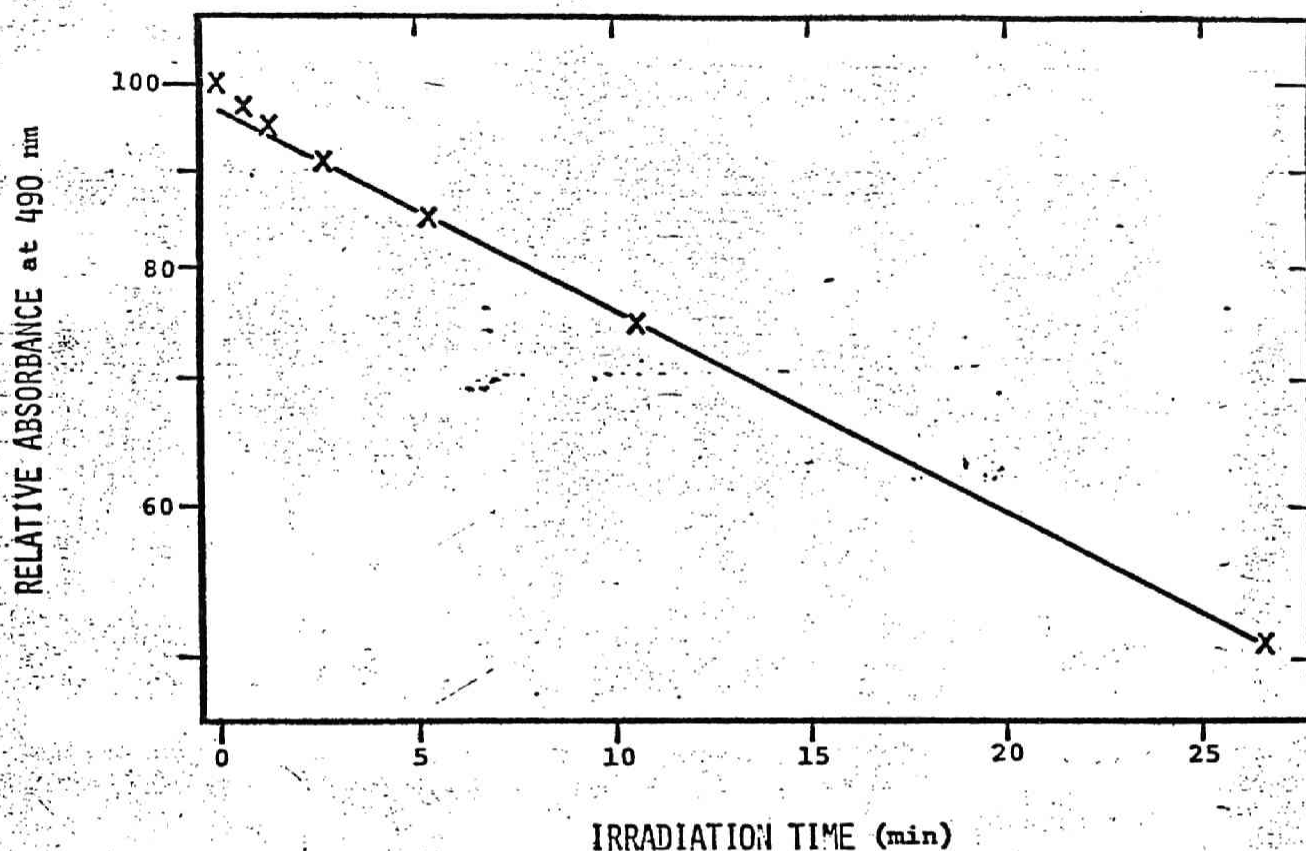


図 4 , ロドプシンとアイソロドプシンの混合物中の両者の量比の決定法

ロドプシン、アイソロドプシンの混合物を室温で 580nm 以上の光で照射し、490nm (両者の等吸収点) の吸光度の減少を照射時間に対して片対数プロットをとった。

遅い成分を $t=0$ に外挿すると、混合に含まれていたアイソロドプシンの量比がわかる。この図では、アイソロドプシンが 97% 含まれている。

5) ピコ秒レーザースパクトロメータ

図5に、本研究所に使用した、ピコ秒レーザースパクトロメータの模式図を示した。この装置は、小林と長倉(1976²⁰⁾)によって報告されたものを、少し変形した装置である。光学系の特徴は、1)エシエロン反射板を利用して、ピコ秒領域の吸光度変化を、単一パルスで測定可能にしたこと、2)測定光をダブルビームとして、レーザ光の強度変化による測定光パルスの、強度と波長分布の空間的なばらつきを補正したことである。以下、図に沿って、光学系を簡単に説明していく。

レーザ発振器として、日本電子製モード同期ルビレーザ(JEOL JLS-R10)を使用した。この装置には、シアン系の色素のほかに色素セルが組み込まれており、20ピコ秒のパルス中(波長: 694.3 nm)を持つパルスの列(10~20本のパルスを含む)が発振する。本研究所では、単一のピコ秒パルスで試料を励起した。そのために、レーザ発振器

から発振したパルス列を SPS (single pulse selector) に通し、単一パルスを取り出した。SPS は、偏光子、ホッケルセル、スローファットを組み合わせた装置で、取り出したパルスの偏光面を、ホッケルセルに高電圧をかけることにより、 90° 回転させ、よりパルスだけ、偏光子を通過させて取り出す装置である。

取り出した単一パルスは、レーザ増幅器により $100 \sim 140 \text{ mJ}$ に増幅した。

その後、角度マッキングした ADP 結晶に集光し、試料を励起するパルス (第 2 高調波、波長 347 nm) を発光させた。

発生した第 2 高調波 (変換効率: 数%, エネルギー: 約 5 mJ) は、ビームスプリッター (BS) で、変換しなかった基本パルス (694.3 nm) と分離し、プリズム (MP) を通し、試料セルに集光した。

分離した基本パルスは、リン酸力により、SPM (self phase modulation) セルに集光した。

すると、パルスのエネルギー密度が非常に大きいため、パルスの自己位相変調がおこり、もとのパルスと同じパルス中を持った白色光パルスが生成する。このパルスを測定光パルスとして使用した。

測定光パルスは、オパールガラス(D)を通すことにより、光の強度と波長分布の空間的にばらつきをなくした。^{次に、} レンズを通して平行光パルスにしたあと、エシエロン反射板で反射させた。エシエロン反射板は、約3mmの間隔を持った階段状の鏡である。測定光パルスは、光の光の鏡面で反射し、階段の往復の光路差(約6mm)だけの時間間隔(19ピコ秒)のずれたパルス列に変換される。このパルス列を、ハーフミラー(H)で2つのパルス列に変換し、一方を、試料の励起後の吸光度変化を測定するために使い、他方は、光の光の光のパルスの空間的なばらつきをチェックするために使った。

励起光パルスと測定光パルス列の時間関係

は、測定光パルス列の前から3番目のパルスが試料を通過するとともに、励起パルスが試料を励起するよう、プリズムを動かして調整した。

試料を通過した測定光パルス列は、光増幅器を通し、OMA (optical multichannel analyzer) に接続した検出器 (Vidicon) で強度を測定し、コンピューター (YHP 9825A) で解析した。

測定方法は次の通りである。いま、試料を通った測定光パルス列の光強度を I_a 、他方の光強度を I_b とする。励起光をあてずに測定した光強度にダッシュをつけて表わせば、吸光度変化 ΔA は、

$$\Delta A = \log(I_a'/I_b') - \log(I_a/I_b)$$

で表わすことができる。

液体窒素温度での測定の場合には、試料の位置に、液体窒素温度用のデュワーを置いた。このデュワーは、一重の魔法瓶で、平行の光

希望を持ってゐる。試料セルは、液体窒素の
なかにかゝるゝと測定を行なふ。

6) ナノ秒レーザースパクトロメータ

図6に、本研究所に使用した、ナノ秒レーザースパクトロメータの模式図を示した。この装置は、小林と長倉(1976)²⁰⁾によ、て報告された。励起光源として、Blumlein型窒素レーザ(波長: 337nm, パルス巾: 3.4ナノ秒, エネルギー: 500kW)を使用し、測光光源として、キセノンフラッシュランプ(パルス巾: 3.6マイクロ秒, エネルギー: 500kW)を使用した。両者は、キセノンフラッシュランプの発光が、ローフに達したときに、レーザが発振するよう、遅延回路を適して、トリガー回路につながれた。試料励起後の吸光度変化は、分光器、光電子増倍管、オシロスコープの組合せで検出された。

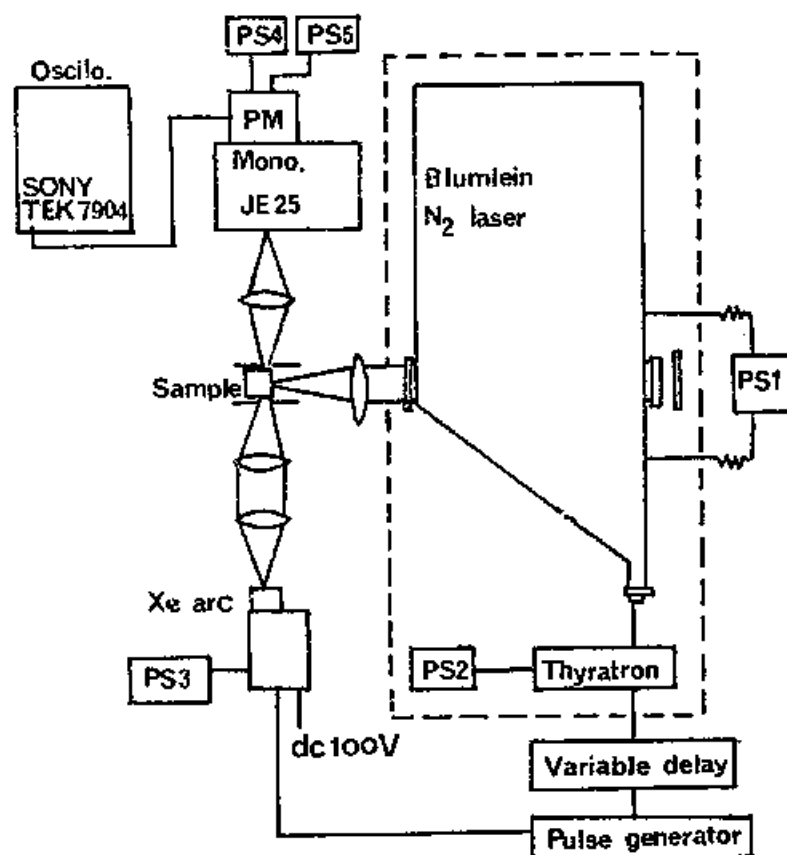


図6, ナノ秒レーザースペクトロメータの
模式図

Mono.: 分光器

Oscilo.: オシロスコープ

PM.: 光電子増倍管

6) 使用した薬品

実験に用いた試薬は、すべて、市販の試薬特級（和光純薬、または、洋行化学のもの）を用いた。

ロドフラン抽出液、あるいは、マイクログライ試料に加えたクリセロールは、和光純薬用特級試薬である。

Ⅲ 結 果

Ⅲ-1. 液体ヘリウム温度での、ロドプシンの光反応

1) イカロロドプシンの吸収スペクトルの温度変化

2% ジギトニンで抽出したイカロロドプシンの可視部の吸収極大 (λ_{max}) は、室温で 480nm にあり、その波長での分子吸光係数 (ϵ_{max}) は、 $33,000 \pm 1,000$ (5回の実験の平均値)、半値巾は 100nm である。遊離のレタニール (エタニール溶液中) の λ_{max} は 378nm , ϵ_{max} は $26,400$ であるから、11-ニシスレタニールは、タンパク質 (オプシン) と結合することにより、 λ_{max} が 102nm 長波長シフトし、 ϵ_{max} が 1.25 倍になる。 —

液体窒素温度 (77K)、あるいは、液体ヘリウム温度 (4K) に試料を冷却すると、 λ_{max} は 488nm , 489nm に移動し、 ϵ_{max} は 室温

の値にくらべて, 1.09 倍, 1.10 倍となった(低温での吸収スペクトル測定には, rapid cooling 法を用い, 低温でクラック(ひび割れ)のない試料を作った)。また, 吸収スペクトルは, シャーペンシノゲを起こし, 半値巾は 96 nm , 94 nm になった。液体窒素温度から液体ヘリウム温度への冷却に于る吸収スペクトルの変化は, 非常に小さいと言える。

低温にしたときを示す ϵ_{max} の増加の割合は, 立休障層を持たないレチナールのシス型(9-シス, 13-シスなど)や, オールトランス型のレチナールが示す割合⁶⁾と同じである。しかし, 11-シスレチナールの, 低温にしたときの ϵ_{max} の増加は, 約 1.6 倍で, 非常に違っている。遊離の 11-シスレチナールは, 室温で, 12-5-シス型と, 12-5-トランス型との混合物になり, 2 おり, 低温にすると, 12-5-トランス型に平衡が傾く²¹⁾。したがって, 遊離の 11-シスレチナールの, 低温にしたとき, ϵ_{max} の異常な増加は, 平衡が一方に傾くこと

により生じたと考えられる。11-シスレタナールを発色団として持つロドプシンが、このような ϵ_{max} の変化を示さないということは、とりもなおさず、ロドプシン中の11-シスレタナールが、遊離のものとちがう状態で存在していることを示している。したがって、ロドプシン中の11-シスレタナールは、12-S-シス型か、12-S-トランス型の、どちらか一方の構造をとっていると考えられる。ロドプシンは α -バンドが非常に大きく、 β -バンドは小さい。これは発色団がより直線に近い構造を取っていることを示しており²²⁾、12-S-トランス型の構造をとっていることを示唆している。

2) 液体ヘリウム温度でのヒプソロドプシンの生成、及び、ヒプソロドプシンの光反応

図7に、ロドプシンを、液体ヘリウム温度で、480 nm 以上の光で照射したときのスペクトル変化を示した。照射時間が増大するとと

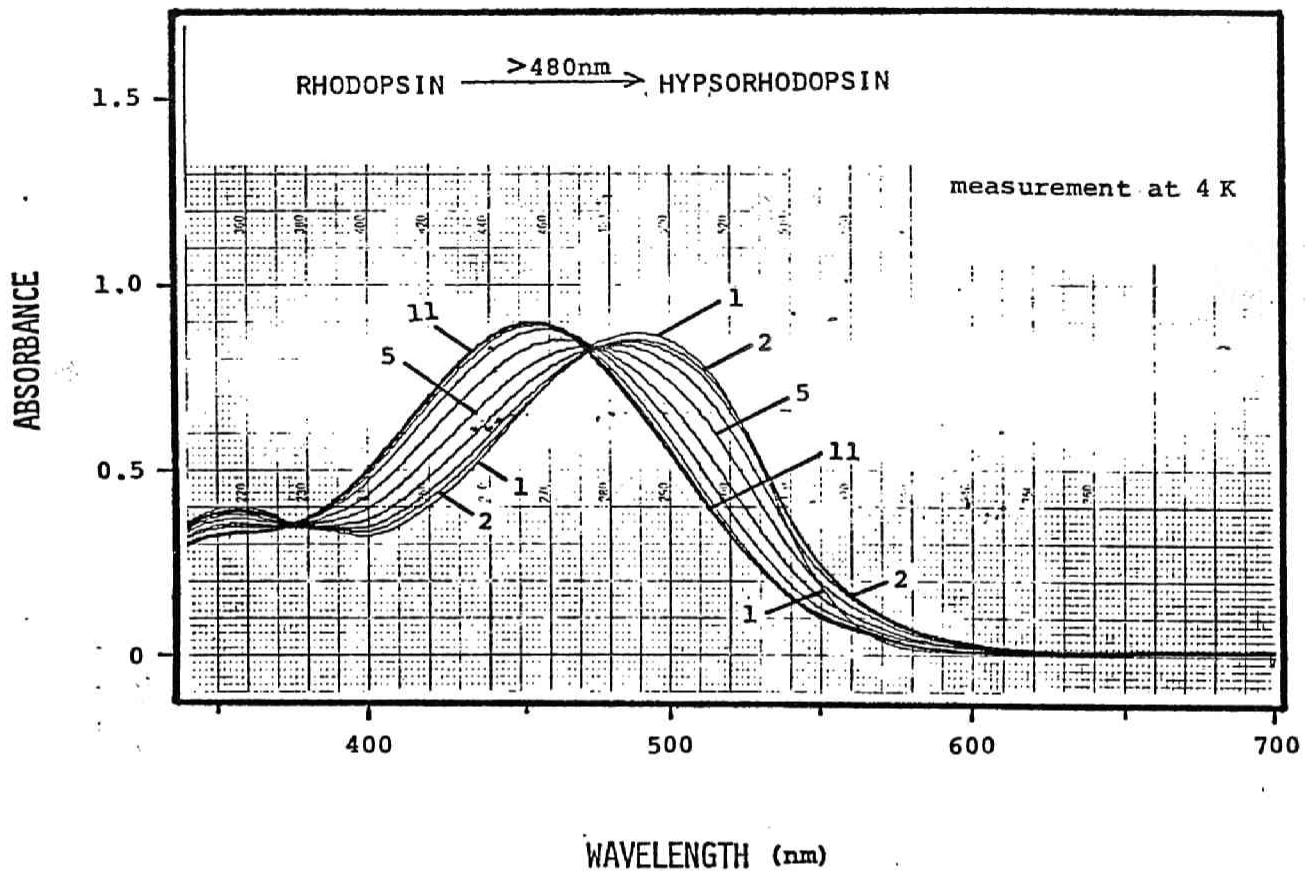


図7 , ロドプシンからヒプソロドプシンが生成する反応。

ジギトニン抽出したロドプシンとグリセロールの混合液(1:2)

を4Kに冷却し、(カーブ1) , 480 nm 以上の光で通算

5", 10", 20", 40", 80", 160", 320", 640", 1280", 2560"

(カーブ2~11) 照射した。

もに、 λ_{max} は、489 nm (カーブ I) から 454 nm (カーブ II) に短波長シフトし、ロドプシンノチリも短波長に λ_{max} を持つ光産物が生成した。この光産物を、ウシのヒメソロドプシンとの類似性から、ヒメソロドプシンと呼ぶ。長時間光照射を続けると、さらに光照射してもスペクトルが動かなくなった。図6では、カーブ10とカーブ11が一致している。すなわち、この照射条件で、試料に含まれるロドプシン、及び、その光産物の間で、光定常状態が成立したことを示している。光定常状態には、ロドプシン、ヒメソロドプシン、ヒメソロドプシンと、少量のバリロドプシンが含まれている。

ロドプシン試料を、5秒間光照射したスペクトル (カーブ¹¹2) は、もとのスペクトル (カーブ1) と、520 nm, 460 nm, 375 nm で交叉した。すなわち、この照射によって、ロドプシンノチリも短波長に λ_{max} を持つ光産物 (ヒメソロドプシン) と、長波長に λ_{max} を持

つ光産物（バソロドプシン）が最初から生成したことを示している。さらに照射を続けると、セプソロドプシンは生成し続け、バソロドプシンは逆に減少した。すなわち、 λ_{max} は短波長移動を続けたか、長波長側の可なり吸収は逆に減少した。

一方、3イソロドプシンを、液体ヘリウム温度で、480 nm 以上の光で照射したときのスเปクトル変化が、図8に示されている。この場合も、ロドプシンを光照射したときと同様、最初の5秒の照射で、短波長側と長波長側の吸収が増大し、セプソロドプシンとバソロドプシンが、同時に生成して来た。

光定常状態のスเปクトルの λ_{max} は、454 nm にあり、ロドプシンを光照射したときと同様の光定常状態が生成した。

セプソロドプシンの吸収スเปクトルは、ロドプシンを 480 nm の光で照射したときに生成する光定常状態のスเปクトルから、次のようにして求められた。

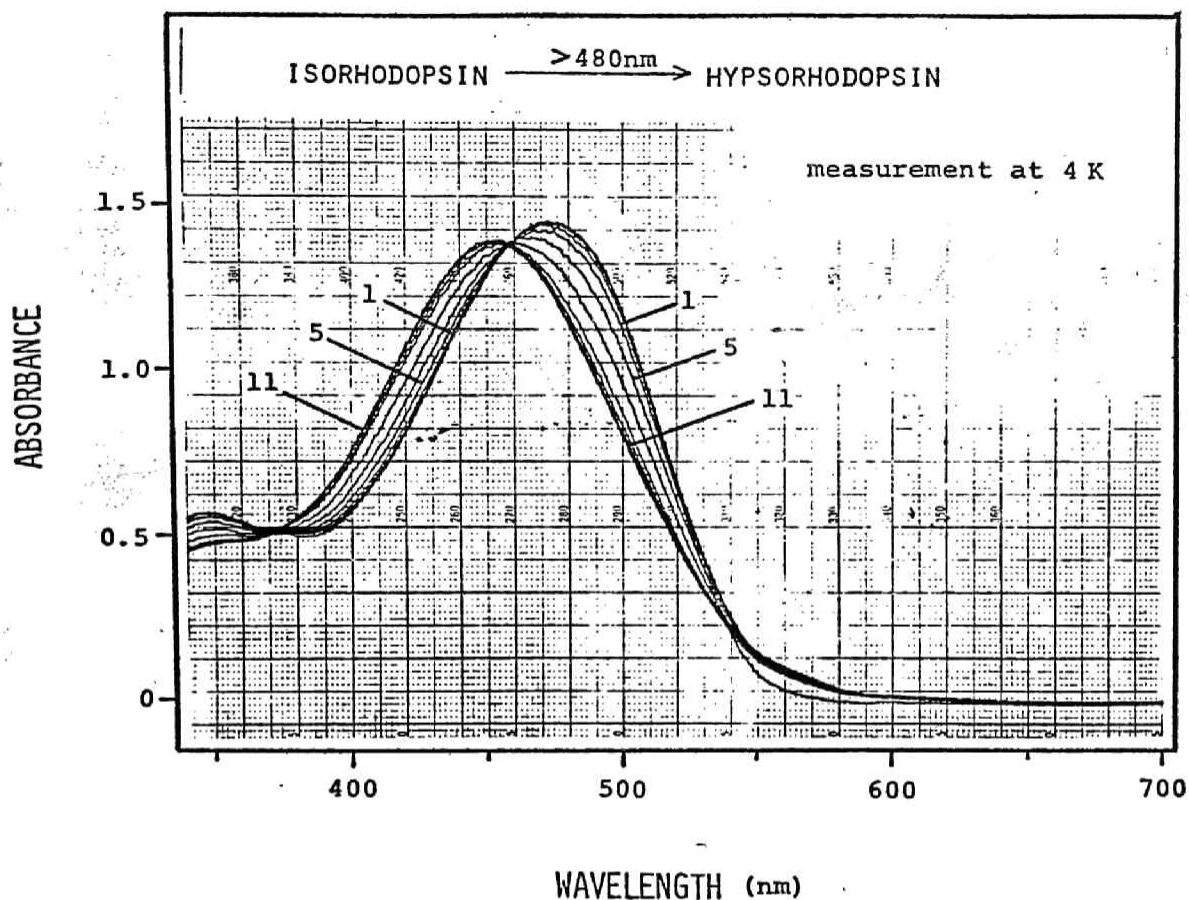


図8, アイソロドプシンからヒプロソロドプシンが生成する反応。

ロドプシンを液体窒素温度で 560 nm 以上の光と 610 nm 以上の
光で照射して作ったアイソロドプシンを液体ヘリウム温度に冷却し
(カーブ 1) 480 nm 以上の光で、通算、5", 10", 20", 40", 80",
160", 320", 640", 1280", 2560" (カーブ 2~11) 照射した。

光定常状態混合物には、ロドプシン、アイソロドプシン、ヒプロロドプシンのほか、少量のバソロドプシンが含まれている。スペクトル計算を簡単にするため、まず、この混合物からバソロドプシンを除く操作を行った。バソロドプシンは、他り3者に較べて、吸収スペクトルが長波長にあるので、長波長の光で混合物を照射すると、バソロドプシンだけか光反応を起こし、ロドプシン、あるいは、アイソロドプシンに変化する。混合物を、液体ハリウム温度で、 570nm 以上の光で、5秒間から順次時間を長くして照射すると、1分間照射したところでスペクトルが変化しなくなる。このようにして、ロドプシン、アイソロドプシン、ヒプロロドプシンを含む混合物がえられた。

次に、この混合物に含まれている3者の量比を計算するために、次のような操作を行った。まず、混合物を常温に温め、スペクトルを測定した。常温に温めると、ヒプロロド

ロドフロシンはカルリメタロドフロシンに変化するが、ロドフロシン、3-イソロドフロシンは、元のまま残る。カルリメタロドフロシンは、430nm 以上に吸収を持たないので、可視部の吸収は、残存のロドフロシンと3-イソロドフロシンに下る。この混合物を“材料と方法4)”に示した方法で光照射して、残存のロドフロシンと3-イソロドフロシンの量比を求めた。

混合物に含まれてゐたロドフロシンの量 C_H は、下記の式の式で与えられる。

$$C_H = \frac{A^0 - A^W}{A^0 - A^b}$$

A : どれどれのスペクトルの 490nm

(ロドフロシンと3-イソロドフロシンの等吸収点) の吸収度。

0 : 実験に便、たもとのロドフロシンの吸収スペクトル。

W : 混合物を常温に温めたスペクトル。

b : 残存のロドフロシン、3-イソロドフロ

シンを、カルリメタロドフロシン

に変化させたときのスペクトル。

このようにして3者の量比を計算すると、
ロドプシン 4%、サイソロドプシン 34%、
ヒメロドプシン 62%となった。したがって、
ヒメロドプシンの吸収スペクトルは、現在
動物のスペクトルから、4%のロドプシンと、
34%のサイソロドプシンのスペクトルを差し
引いたものとして求められた。このようにし
て求められた吸収スペクトルを図12に示した。

ヒメロドプシンは、446 nm に λ_{max} を持ち、
 ϵ_{max} は、ロドプシンの 1.16 倍である。現在ま
でに報告されているヒメロドプシン（すべ
て、脊椎動物のロドプシンに由来²³⁾）は、
すべて、 λ_{max} が 430 nm にあり、 ϵ_{max} は、それ
ぞれのロドプシンより小さいのは興味深い。

次に、液体ヘリウム温度で合成したヒメロ
ドプシンが、温度を上げていくと、どうい
うな変化を有するかを検討した。すなわち、
ロドプシンに、液体ヘリウム温度で、440 nm

以上の光を照射して、主としてロソロドグロシンからなる光伝導状態を作った。この中には少量のバソロドグロシンが含まれているので、これを除くため、 570 nm 以上の光で照射し、バソロドグロシンをロドグロシンに変換させた。このようにして得られた、主としてロソロドグロシンからなる混合物を、液体ヘリウム温度から液体窒素温度まで温めた時のスペクトル変化を図9に示されている。図の右上には、 540 nm の吸収度の変化を、スペクトルを測定した温度に対して目盛り結果が示されている。図が示すように、混合物は、 35 K (-238°C)以上で、 476 nm と 366 nm に等吸収点を作って変化した。これは、混合物中の一種類の光産物が、温度上昇によって、異なるスペクトルの性質を持つ産物に変化したことを示している。混合物中に含まれるロドグロシンとロソロドグロシンのスペクトルは、この温度領域ではほとんど変化しない。したがって、観察されたスペクトル

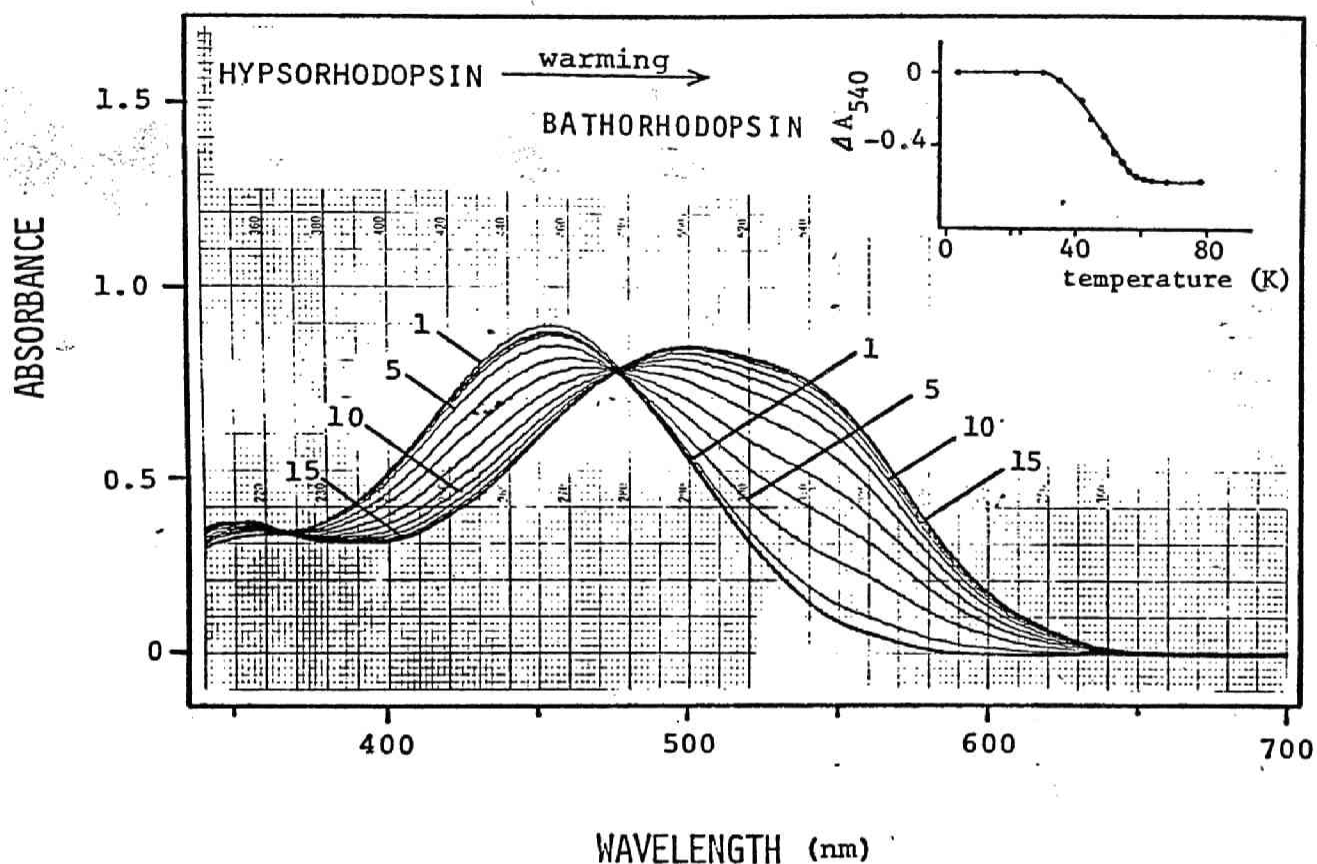


図 9, 温度を上げるにつれて, ヒプソロドプシンから
バソロドプシンが生成する反応.

液体ヘリウム温度において、ロドプシン抽出液を 480nm 以上の
光で、光平衡状態が成立するまで照射し、その後 570nm 以上の光を
1分間照射した試料(カーブ 1)の温度を、それぞれ、22K, 30K,
34K, 45K, 49K, 52K, 54K, 56K, 58K, 61K, 63K, 65K,
70K, 77K (カーブ 2~15) まで上げた。

右の図: 540nm の吸収の増加を、その時の温度に対して目をつけた。

ル変化は、セグロロドグシンが、35 K 以上で、変化したことを示している。生成した産物の吸収スペクトルを計算すると（計算の仕方、前述のセグロロドグシンの場合と同様）、液体酸素温度でロドグシンから光照射で作ったセグロロドグシンのものと実験誤差内で一致した。したがって、セグロロドグシンは、35 K 以上でセグロロドグシンに変化して行く。呼吸点の存在から、両者の間には所定な中間体が存在しないことがわかった。

すでに見られたように、ロドグシンを、液体ヘリウム温度で 480 nm 以上の光で照射すると、セグロロドグシンとセグロロドグシンの両方が生成した。ただ、照射波長がセグロロドグシンの吸収しやす^い波長なので、光定常状態混合物中のセグロロドグシンの量が少な^いか、たとえらぬ。次に、ロドグシンを、セグロロドグシンよりセグロロドグシンが吸収しやす^い波長で照射することをも試みた。図10.5図には、ロドグシンを液体ヘリウム温度で 437 nm

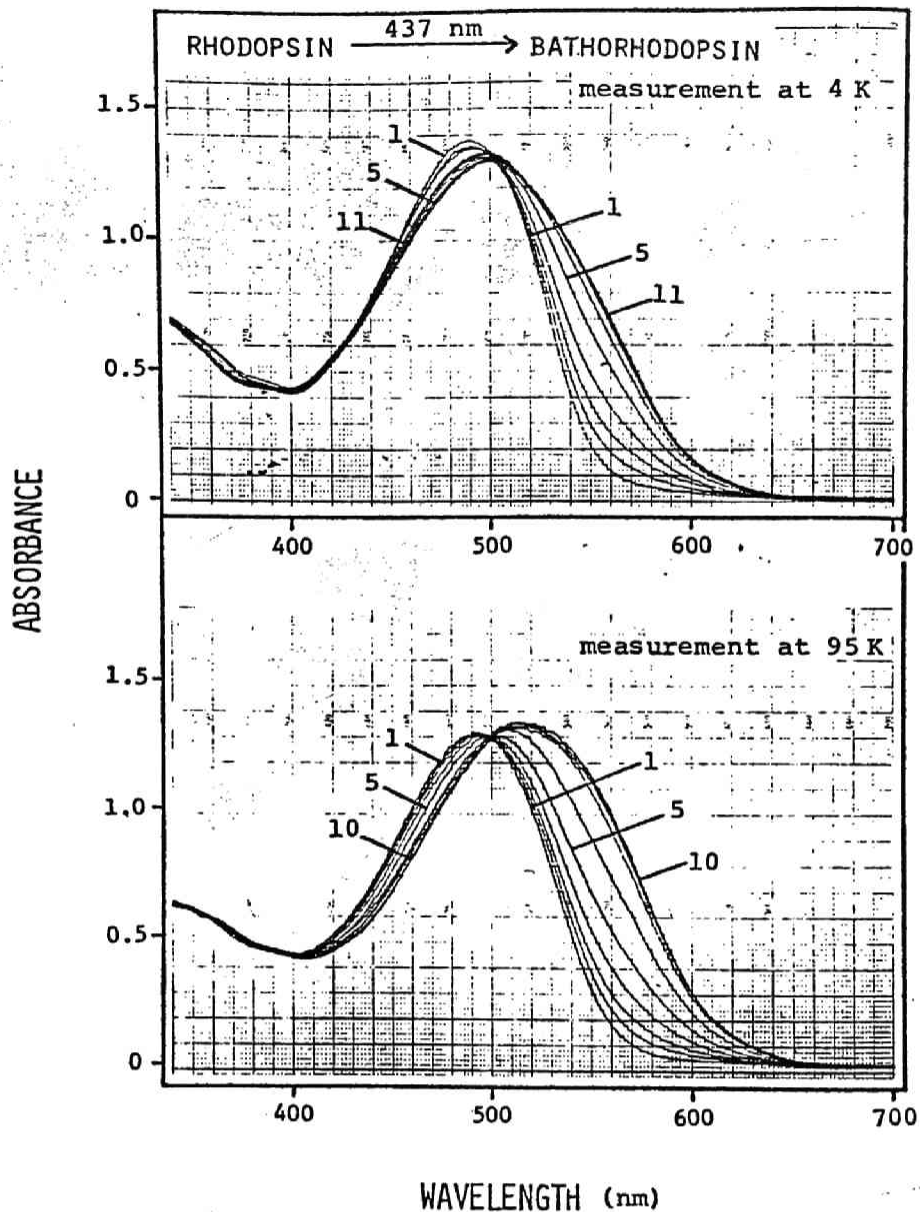


図 10. ロドプシンからバソロドプシンが生成する反応.

上図: 液体ヘリウム温度で, ロドプシン抽出液 (カーブ 1) を

437 nm の光で, 通算, 5", 10", 20", 40", 80", 160", 320",

640", 1280", 2560" (カーブ 2~11) 照射した。

下図: 液体窒素温度で 上図と同様の操作 (ただし

最終照射時間 1280") を行った。

の光で照射したときのスペクトル変化が示されている。図の通りに、照射時間が長くなるとともに吸収スペクトルは長波長シフト（ 489 nm から 502 nm ）し、吸収度が減少した（カーブⅠからカーブⅤ）。その後、スペクトルが少し短波長シフト（ 502 nm から 498 nm ）し、吸収度も少し増加してから光定常状態が成立した（カーブⅤからカーブⅡ）。後のスペクトル変化は、バソロドプロシンからメソロドプロシンが生成したことを示している。

この光定常状態を液体窒素温度で過めても、そのスペクトルはほとんど変化しなかった。しかし、 570 nm 付近の吸収が少し増加し、 420 nm 付近の吸収が少し減少した。この少量の変化の説明として、2つの可能性を考えることが出来る。1つは、光定常状態が少量のメソロドプロシンを含んでいたという可能性であり、もう1つは、光定常状態混合物に含まれていたロドプロシンとその光産物や吸収スペクトルが、温度によって変化した可能性で

ある。もし後者が正しいならば、混合物を液体ヘリウム温度に再び冷却したとき、冷却する前のスペクトルと同じスペクトルが得られるはずである。結果は、スペクトルは一致しなかった。この操作中に試料の状態が変化した可能性（たとえば、試料セルに霜がつかくなど）を除外するため、混合物を、液体ヘリウム温度で、再び、同じ波長の光で照射した。もし後者が正しいければスペクトルは変化しないはずであるが、結果は、 420nm 付近の吸収が増大し、 570nm 付近の吸収が減少した。以上で、光応答状態混合物は、少量のヒドロロドプシンを含むのではないかと考えられる。再照射したときの 600nm の吸収の減少（ヒドロロドプシンから熟銅に生成したバソロドプシンが、光照射にトランス、再びヒドロロドプシンに戻ったことを示している）からヒドロロドプシンの量を計算すると、約 2% であった。

図 10 下図には、ロドプシンに、液体酸素温度で 437nm の光を照射したときのスペクトル

変化が示されてゐる。図から明らかなるように、両者の光定常状態のスペクトルが違つてゐる。実際、それぞれの場合の混合物中のロドプシンと光の光産物の量を計算すると、表1のようになる（計算方法は、ヒアソロドプシンのスペクトルを計算したときと同じ）。液体ヘリウム温度でロドプシンを照射したときの方が、残存のロドプシンとアイソロドプシンの量が多い。これは、液体ヘリウム温度において所定に存在するヒアソロドプシンが、光定常状態混合物の量比に大なる影響を与えてゐることとを示してゐる。ヒアソロドプシンは $446\text{ m}\mu$ に λ_{max} を持つので、ロドプシンと比べて容易に $437\text{ m}\mu$ 光を吸収する。したがって、もし、ヒアソロドプシンが光を吸収してロドプシンからアイソロドプシンに変化するならば、この波長の光で生成する光定常状態に含まれるロドプシンとアイソロドプシンの量の多いことが説明される。

ヒアソロドプシンの光産物を調べるには、

表 1. ロドプシン抽出液を 437 mμ で光照射状態
を生成させたときの 混合物中の ロドプシン の他の量比

	at Liq. He Temp.	at Liq. N ₂ Temp.
Rhodopsin	10 ± 2%	8 ± 1%
Isorhodopsin	40 ± 2%	31 ± 1%
Bathorhodopsin	48 ± 5%	61 ± 3%
Hypsorhodopsin	2%	—

セプロロドグシンのみを含む試料を調製し、
 それを光照射して、何に変化するかをみれば
 よい。しかし、セプロロドグシンは、他の3
 者比べて、吸収極大が短波長にあるにもか
 かかわらず、セプロロドグシンのみを含む試料
 は調製できなかった。これは、セプロロドグ
 シンの発色団の構造を推定する際、興味ある
 現象である。

それほさておき、図11には、セプロロドグ
 シンの光反応のスペクトル変化が示されてい
 る。カーブ1は、ロドグシンに液体ヘリウム
 温度で 480nm 以上の光を照射して作った光定
 常状態混合物で、62%のセプロロドグシンが
 含まれている。これを 437nm の光で5秒間照
 射した。このスペクトル(カーブ2)は、カ
 ーブ1と 463nm で交わる。図12から、セプロ
 ロドグシンと、3イソロドグシン、ロドグシ
 ン、バソロドグシンとの等吸収点では、それ
 ら、 458nm 、 470nm 、 476nm 、3イソロドグ
 シン、ロドグシンとバソロドグシンの光では、

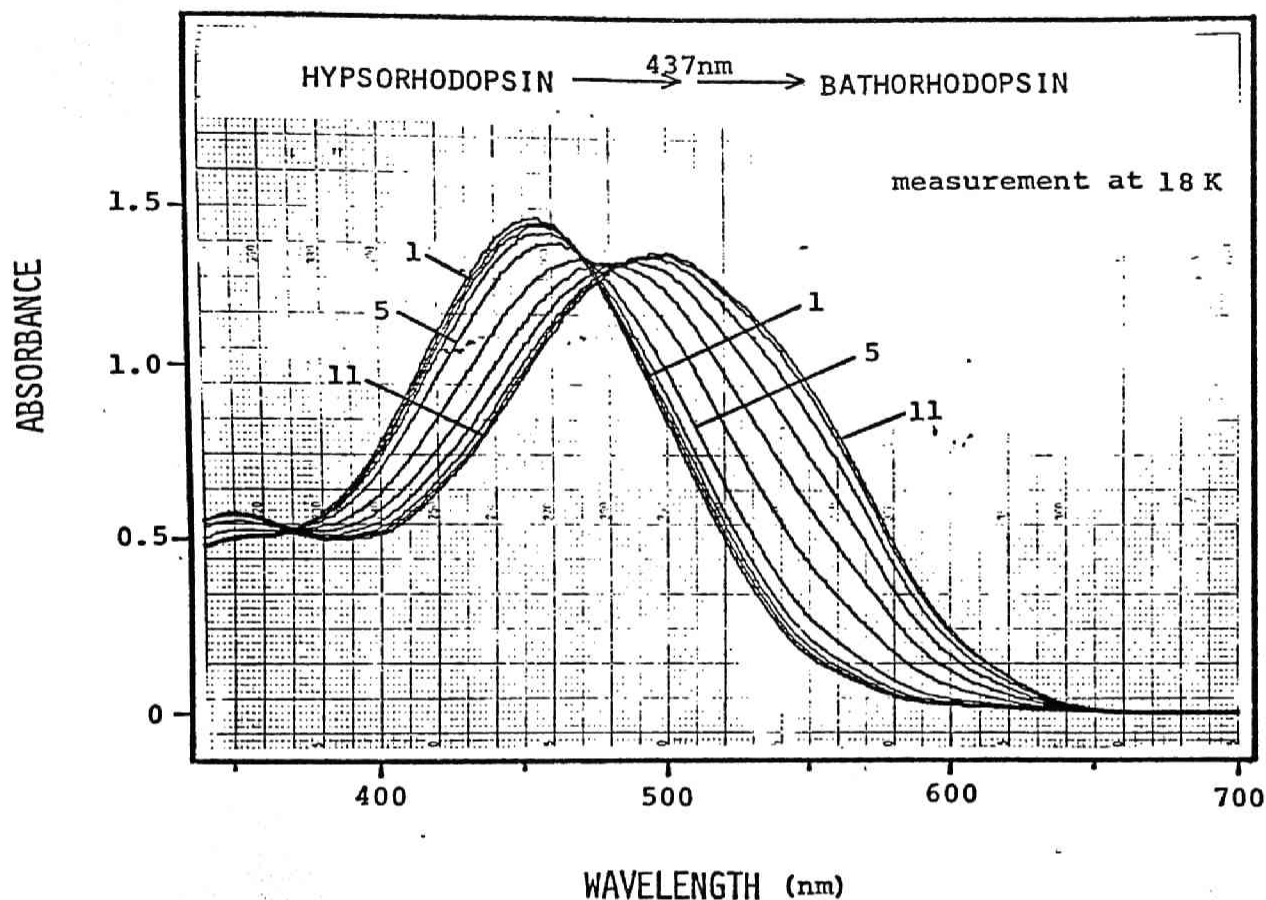


図 11 ヒプソロドプシンから、ロドプシン、3イソロドプシンを通して、
バソロドプシンが生成する反応。

18 K で ロドプシン抽出液を 480 nm 以上の光で光安定状態に
なすまで照射した (カーブ 1) あと、437 nm の光で、通算

5", 10", 20", 40", 80", 160", 320", 640", 1280", 2560"

(カーブ 2~11) 照射した。

493 μ m, 495 μ m である。もし C ソロドプロシンがバソロドプロシンのみに変化するならば、カーブ又又は、少なくとも 476 μ m より長波長にあるはずである。したがって、 C ソロドプロシンは、ロドプロシン、あるいは、アイソロドプロシンにも変化したと考えることが出来る。この後のスペクトル変化は、 C ソロドプロシンから生成したロドプロシンとアイソロドプロシンが、バソロドプロシンに変化したことを示している。最終的なカーブ（カーブII）は、ロドプロシン、あるいは、アイソロドプロシンを、437 μ m の光で照射したときに生成した光応答状態混合物のカーブと同じものになった。

図12には、バソロドプロシンに光をあてたときのスペクトル変化が示されている。バソロドプロシンは、液体ヘリウム温度でロドプロシンを光照射したときに生成する産物のうち、もっとも長波長側にある。したがって、バソロドプロシンと含む混合物を長波長の光で照射することによって、バソロドプロシンのみの光反

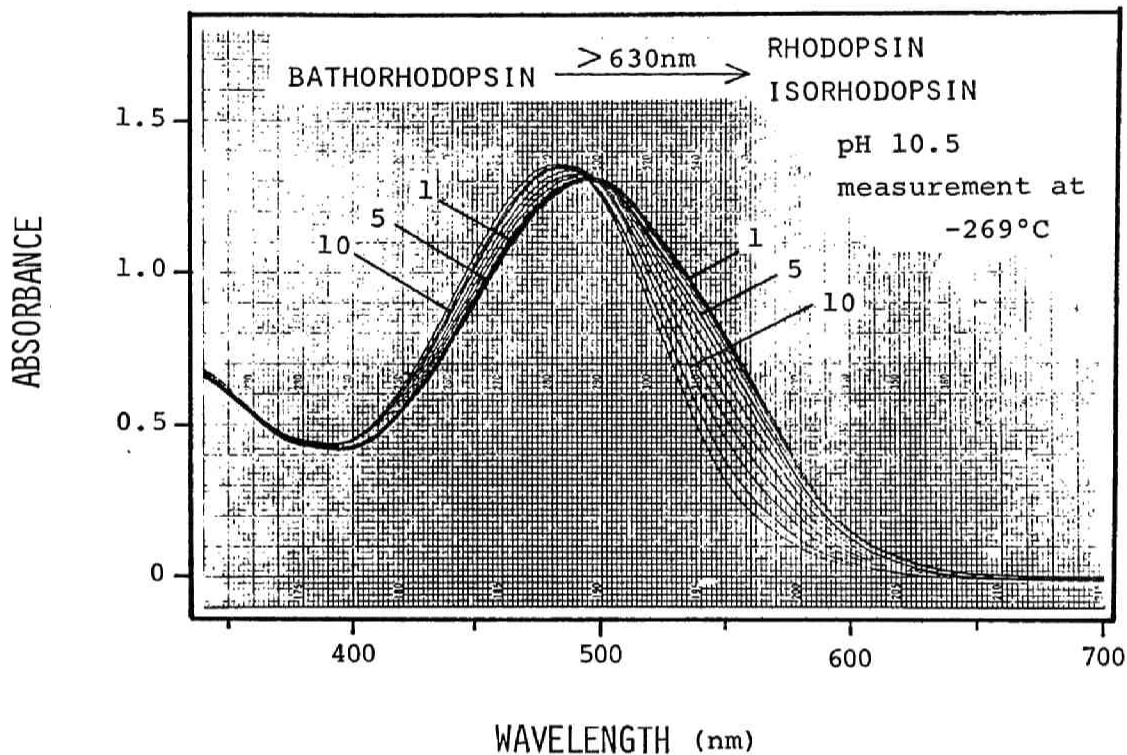


図 12, バソロドプシンからロドプシンとイソロドプシンの生成する反応。

ロドプシン抽出液を、液体ヘリウム温度で、437nmの光で光状態が成立するまで照射し、その混合物(カーブ 1)に 630nm 以上の光で通算、5", 10", 20", 40", 80", 160", 320", 640", 1280", 2560", 5120" (カーブ 2~12) 照射した。

応を調べる事ができる。図では、液体ハリウム温度でロドポシンに 437nm の光を照射して作った光定常状態混合物に、 630nm 以上の光を照射したときのスペクトル変化が示されている。図の下の方に、等吸収点が 495nm 付近にあり、これは、バソロドポシンが、ロドポシンとイソロドポシンに変化したことを示している。

図13に、液体ハリウム温度で生成する光産物の吸収スペクトルを示した。また、表2に光産物のスペクトルから求まる吸収特性を示した。これらに関しては、考察の項で議論する。

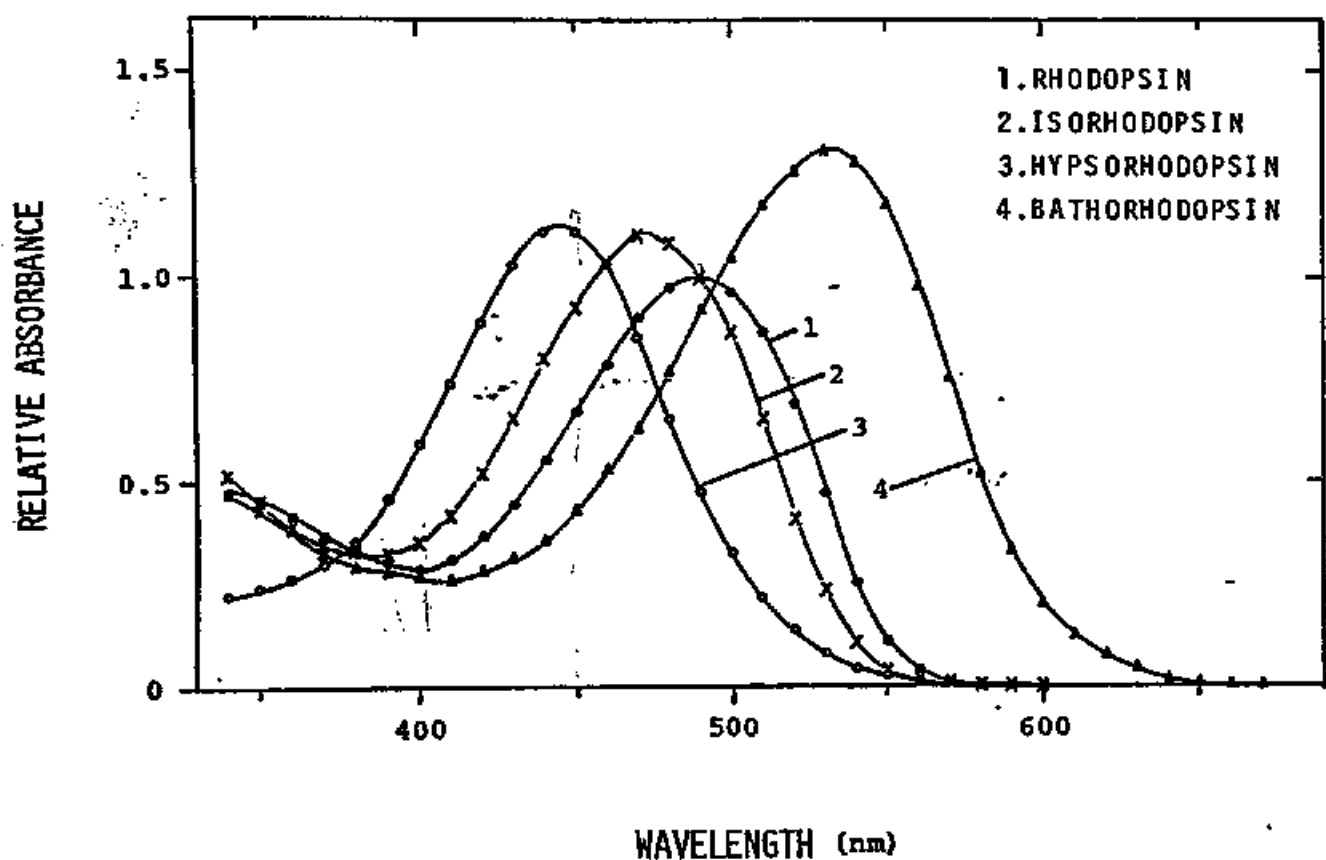


図 13, 液体ヘリウム温度での ロドプシン (カーブ 1),
 アイソロドプシン (カーブ 2), ヒプソロドプシン (カーブ 3),
 バソロドプシン (カーブ 4) の 吸収スペクトル
 (横軸: 波長)

表2, ロドプシン, その他の中間体の吸収特性

	λ_{\max}	Relative ϵ_{\max}	Half band width	Relative oscillator strength (a)	(b)
Rhodopsin	489 nm	1.00	4,100 cm^{-1}	1.00	1.00
Isorhodopsin	472	1.13	4,200	1.15	1.24
Hypsorhodopsin	446	1.16	4,500	1.31	1.42
Bathorhodopsin	534	1.31	3,800	1.30	1.17

(a) 波数プロットした吸収スペクトルの面積から計算した。

(b) 吸収スペクトルの λ_{\max} 下りも長波長側がガウス曲線で近似できると仮定して計算した。

したがって、(a) のほうが正確である。

Ⅲ - 2, セプロロドポシン, バソロドポシン の, マイクロビライ中での生成

前述の実験は, ロドポシンを2% ジギトニンで抽出した試料にっして行な, たものであり, 網膜中で, セプロロドポシンやバソロドポシンが生成することを確認するのは重要である。イカの網膜中には, ロドポシン以外の感光色素としてレタノウロムや, 多量の遮蔽色素(オモウロム)が存在するので, 網膜そのものをを用いて測定することが困難である。したがって, ロドポシンの存在する膜分画であるマイクロビライを用いて, セプロロドポシンやバソロドポシンが生成するかどうかに調べた。

マイクロビライ中のロドポシンの吸収スペクトルの λ_{max} は, 常湿で 480nm にあり, 2% ジギトニン抽出液の場合と変わらなかった。

液体窒素温度で, マイクロビライ中のロドポシンを 437nm の光で照射すると, ジギトニン抽出液の場合と同様, スペクトルが長波

長シフトし、バソロドプシンの生成が見られた。図 14 に、マイクロビライ中で生成したバソロドプシンと、ロドプシンの差スペクトルを示した。比較のため、抽出液で測定したスペクトルも示した。図の通りに、両者は実験誤差内で一致した。

溶液ハリウム濃度で、マイクロビライ試料を 480 nm 以上の光で照射すると、抽出液の場合と同様、セプロソロドプシンの生成が見られた。また、光照射した試料の濃度を上げると、約 30 K でセプロソロドプシンがバソロドプシンに変化した。セプロソロドプシンとバソロドプシンの差吸収スペクトルは図 15 のようになった。図の通りに、マイクロビライ中と抽出液での差スペクトルの違いはほとんどない。以上のことから、セプロソロドプシンもバソロドプシンも、ジギトニン抽出液だけでなく、マイクロビライ、ひいては、網膜中でも生成すると結論できる。

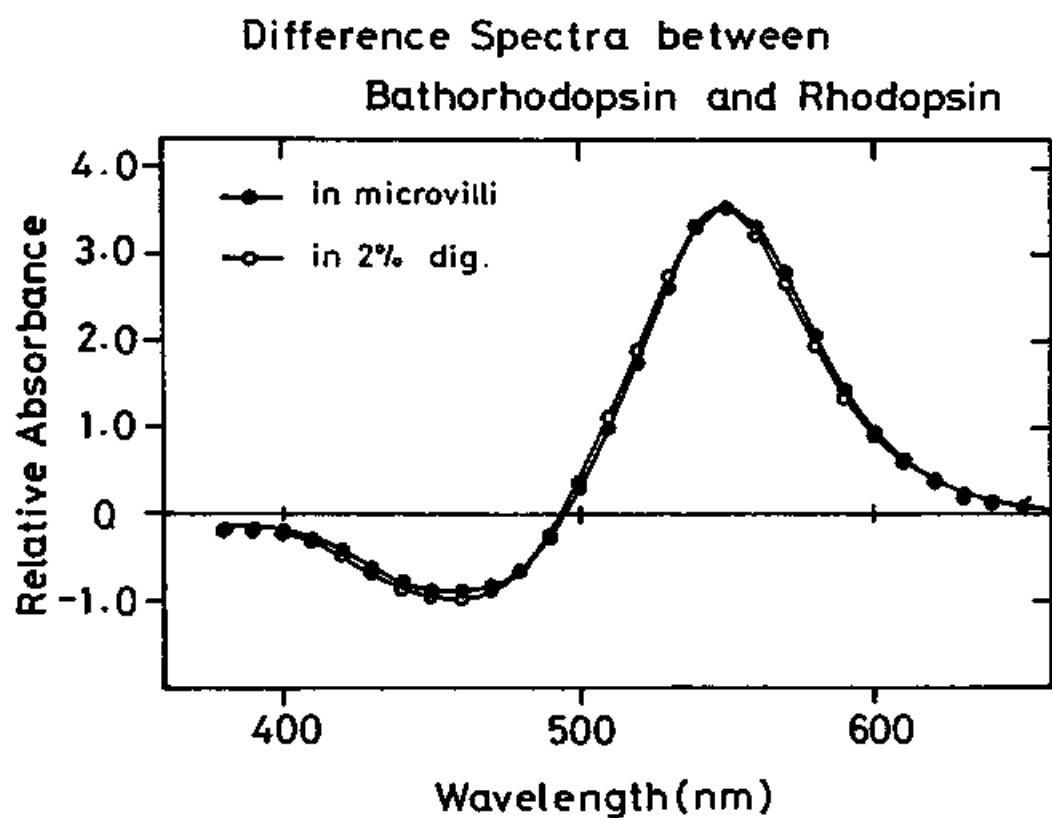


図 14, バソロドプシンとロドプシンの差吸収

スペクトル (液体窒素温度で測定)

● : マクロビライ試料

○ : ジギトニン抽出液

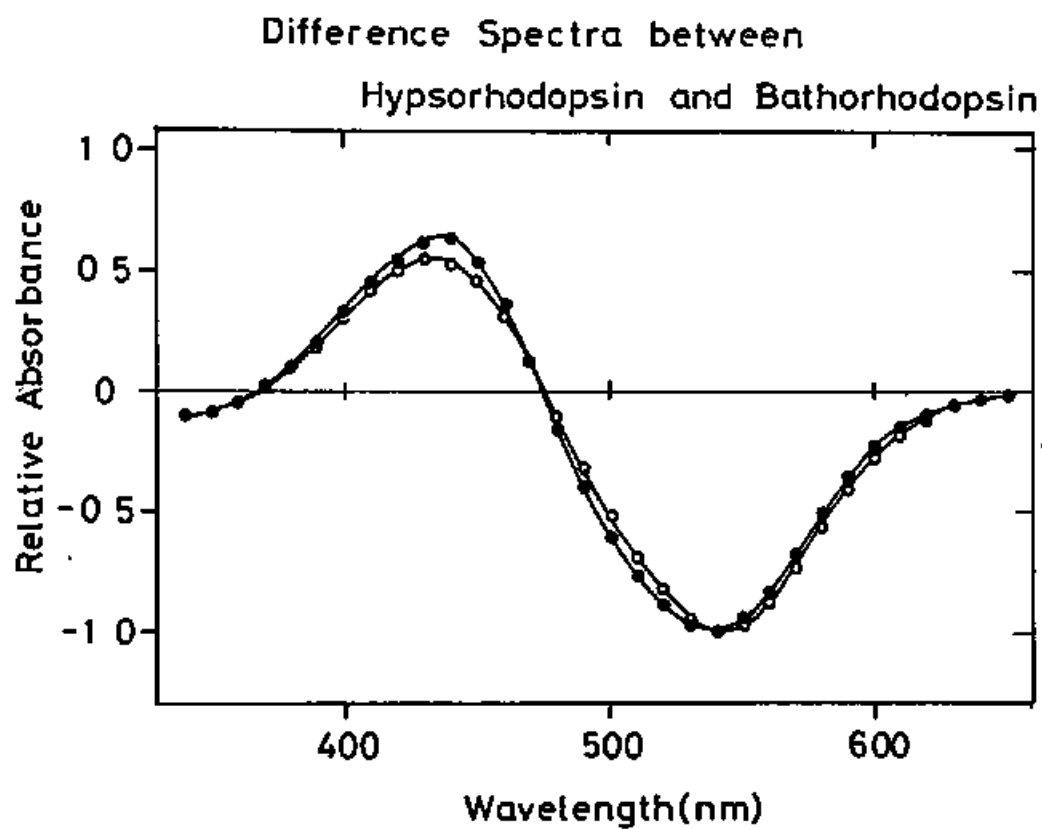


図 15, ヒプソロドプシンとバソロドプシンの
差吸収スペクトル (液体ヘリウム温度で
測定)

—●— : マイクロビライ試料

—○— : ジギトニノ抽出液

Ⅲ - 3. ロッド状のレーザ-ホトリシス

前述のように、ロッド状を極低温で光照射すると、ロッド状とバソッド状という中間体(中間状態)が生じた。次の問題は、ロッド状が、生理的経路で光を吸収しても、このような中間状態を通ずのか、である。さらに、もし通ずるなら、光を吸収後、直接ロッド状態に変化するのか、それとも、バソッド状態に変化するのか、あるいは、両方の状態に同時に変化するのかの問題になる。そこで、モード同期ルビ-レーザ-から発生するピコ秒パルス(波長: 347.2 nm , パルス幅: 20 ピコ秒)を利用してロッド状を励起し、ピコ秒領域の吸収変化を測定した。また、ダイツ4屋素レーザ-から発生するナノ秒パルス(波長: 337 nm , パルス幅: 3.4 ナノ秒)を利用して、ナノ秒領域の吸収変化を測定した。

1) 液体ヘリウム温度で、ロドプシンを 347nm の連続光で照射したときのスペクトル変化。

本所算で、ロドプシンを励起した光パルスの波長は 347nm (あるいは... 337nm) である。この波長では、ロドプシンの β -ローブを励起することになる。したがって、実験を行う前に、ロドプシンを、液体ヘリウム温度で 347nm の光で照射したときのスペクトル変化を測定した(図16)。

図のように、短い照射時間で、ロドプシンに由来する 490nm 付近の吸収が減少し、ロソロドプシン、バソロドプシンに由来する、 420nm 付近、 580nm 付近の吸収が増大した。

さらに照射を続けると、ロソロドプシンの生成を示す 460nm 付近の吸収が増大し、最終的に、4番の光定常状態が成立した。図の右に、混合物中に含まれるロソロドプシンとバソロドプシンの量を、照射時間に対して目もった図を示した。両者の量は、以下のようにして見積られた。混合物のスペクトルの

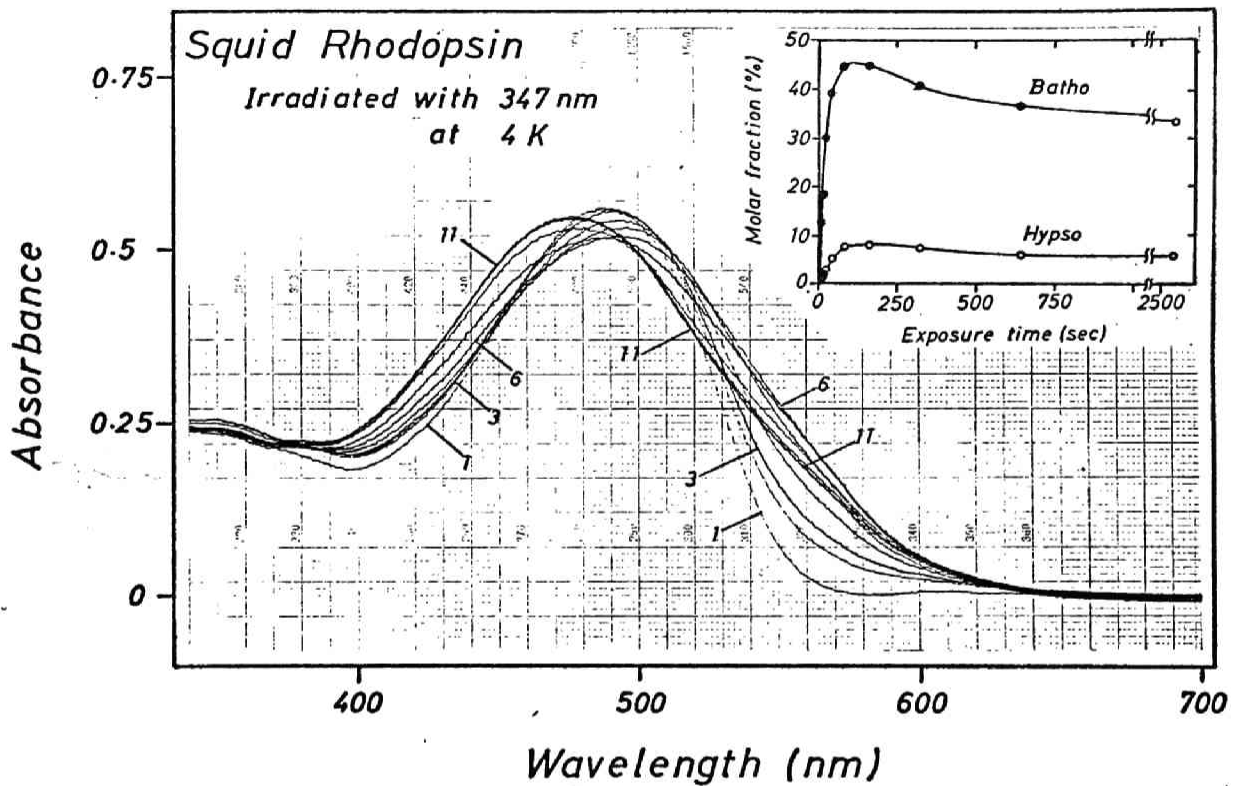


図 16, 近紫外光照射に於けるロドプシン,

バソロドプシンの生成

ロドプシン抽出液を液体ヘリウム温度まで冷却し,

(カーブ 1) 347 nm の光を 通算 5", 10", 20", 40"

80", 160", 320", 640", 1280", 2560" (カーブ

2~11) 照射した。

挿入図 ロドプシンとバソロドプシンの生成量を

時間に対して見わたった。(本文参照)

うち、 590mm 以上の吸収度は、混合物に含まれるバソロドプシンのみに由来する（図13参照）。したがって、それぞれの時間の混合物のスペクトルの 590mm の吸収度から、含まれるバソロドプシンの量を計算した。次に、それぞれの混合物のスペクトルの 492mm （液体ハリウム温度での、ロドプシンとアソロドプシンの等吸収点）の吸収度とロドプシンのスペクトル（カーブ1）の 492mm の吸収度との差から、混合物に含まれるバソロドプシンの寄与を引くと、混合物に含まれるセロロドプシンの量を見積りることが出来る。

2) 常温、及び、液体窒素温度で、ロドプシンをピコ秒パルスで励起した後のスペクトル変化。

図13から、もし、常温でロドプシンが光を吸収した後、直接セロロドプシンに変化するならば、 430mm 付近の吸収度が増加する。また、バソロドプシンに変化するならば、 550mm

付近の吸光度が増加する。

図17に、ピコ秒パルスでロドプシンを励起した後の、430nm（上図）と550nm（下図）の吸光度変化を示した。430nmの吸光度は、励起直後増大し、その後、徐々に減少した。この変化は、ロドプシン励起直後に、ヒグソロドプシンが生成し、その後、徐々に減少していく過程が測定されたと考えられる。ヒグソロドプシンの生成過程は非常に速く、測定装置の分解能外であった。ヒグソロドプシンの崩壊過程の時間数 $\tau_{1/2}$ は、単一指数曲線

$$A(t) = -A(\infty) [1 - \exp(-t/\tau_{1/2})]$$

を仮定し、コンピュータ（日立製、Hitac 10-II）を用いて、実験値が、この曲線にも、最も合うように求めた。ただし、 $A(\infty) = A(0) - A'(\infty)$ で、 $A(0)$ 、 $A'(\infty)$ は、それぞれ、励起直後、励起無限時間後の吸光度である。この実験では、励起無限時間後の吸光度は測定できないので、実験値が、上式に最も合う下

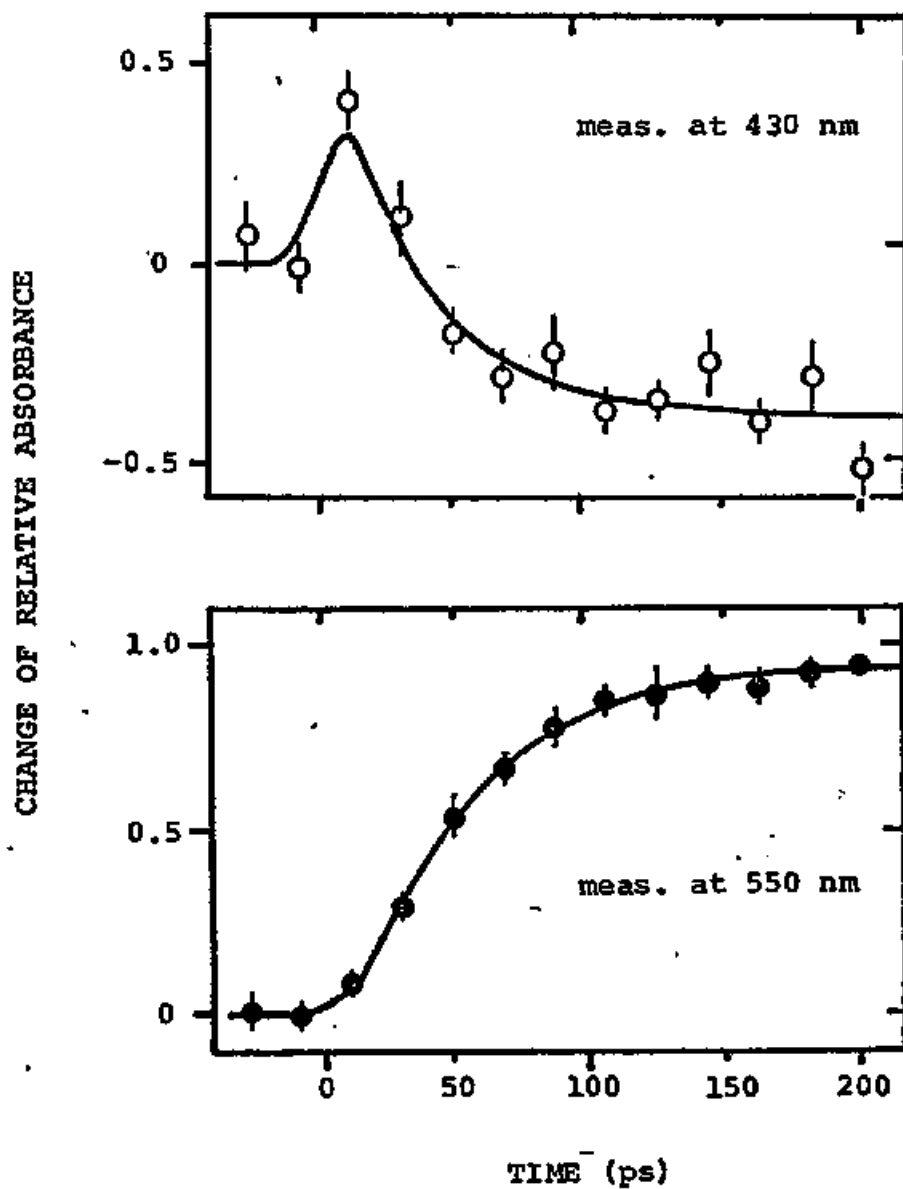


図 17 21°C での ヒメソロドフィン, バソロドフィンの生成

ロドフィンの抽出液を, 21°C で ヒメソロドフィン (波長: 347 nm
パルス幅 20 ピコ秒) で 励起した後の, 430 nm (上図)
と 550 nm (下図) の 吸光度変化を 時間に対して
図示した。

うに求めた。この下りにして計算した時定数は、 45 ± 10 秒 (6 回の平均) であつた。

一方、 550 m の吸光度は、崩壊後陳々に増加した。この変化は、バソロドプシンの生成過程を表わしてゐると考えられる。生成の時定数を計算すると、 50 ± 10 秒であつた (10 回の平均)。

以上の結果から、ロドプシンは、生理的濃度でも、ヒバソロドプシン、バソロドプシンの状態を通ることか示した。また、ヒバソロドプシンの崩壊の時定数と、バソロドプシンの生成の時定数が、実験誤差内で一致すること、ヒバソロドプシンがバソロドプシンの前駆体であることも示してゐる。すなわち、ロドプシンの分解産物はヒバソロドプシンである。上記の結果は、試料の pH ($\text{pH } 10.5$ と $\text{pH } 7.0$) に依り、変化することはない。

上記実験を行つた際、ロドプシン光変換過程の吸光度変化に、ロドプシンの光再生過程¹⁵⁾の吸光度変化が混じつてゐる。特に注

惹いた。ロドプシンの光反応過程とは、ロドプシン光変換過程の最終産物である、アイソドメタロドプシン、あるいは、ツルカリメタロドプシンが光を吸収してロドプシンに戻る反応である。このため、試料は、2回の光励起による吸光度変化を測定したあと、新しい試料ととり変えた。1回の光励起にあって、試料中のロドプシンの割合が、メタロドプシンに変化した。また、実際に、ツルカリメタロドプシンに光パルスをあて、その後の吸光度変化を測定した(図18)。図のように、430 nm の吸光度は、励起後、徐々に増大した。生成の時定数は、 60 ± 10 ピコ秒(4回の平均)であった。したがって、図16に示された、励起直後の430 nm の吸光度の増大は、ロドプシンがヒポソロドプシンに変化したものである。

ヒポソロドプシンの常温での生成過程は、測定装置の分解能外である。そこで、試料を液体窒素温度に下げ、同様の実験を行なった。図19にも、結果が示されている。図のように

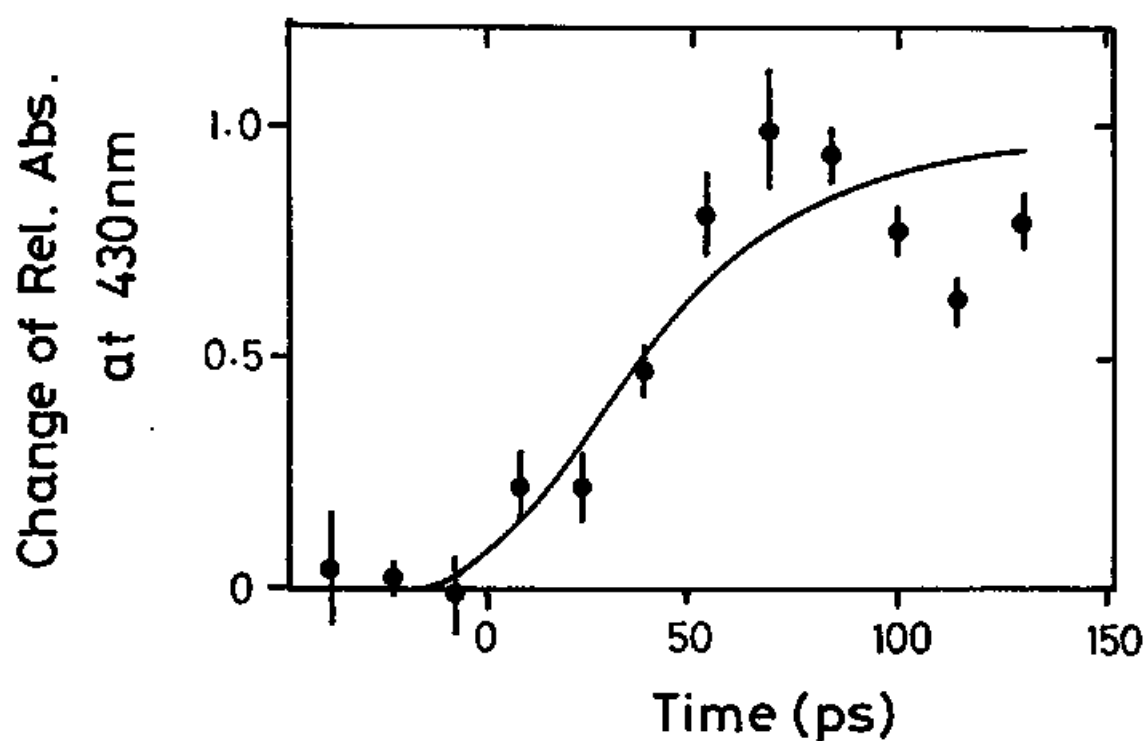


図 18, アルカリメタロドグロシンを 590nm パルスで励起した後の 430nm の吸光度変化。

ロドグロシンド抽出液 (pH 10.5) を 590nm 以上の光で照射してアルカリメタロドグロシを作り、 590nm パルスで励起後、 430nm の吸光度変化を時間に対して計った。

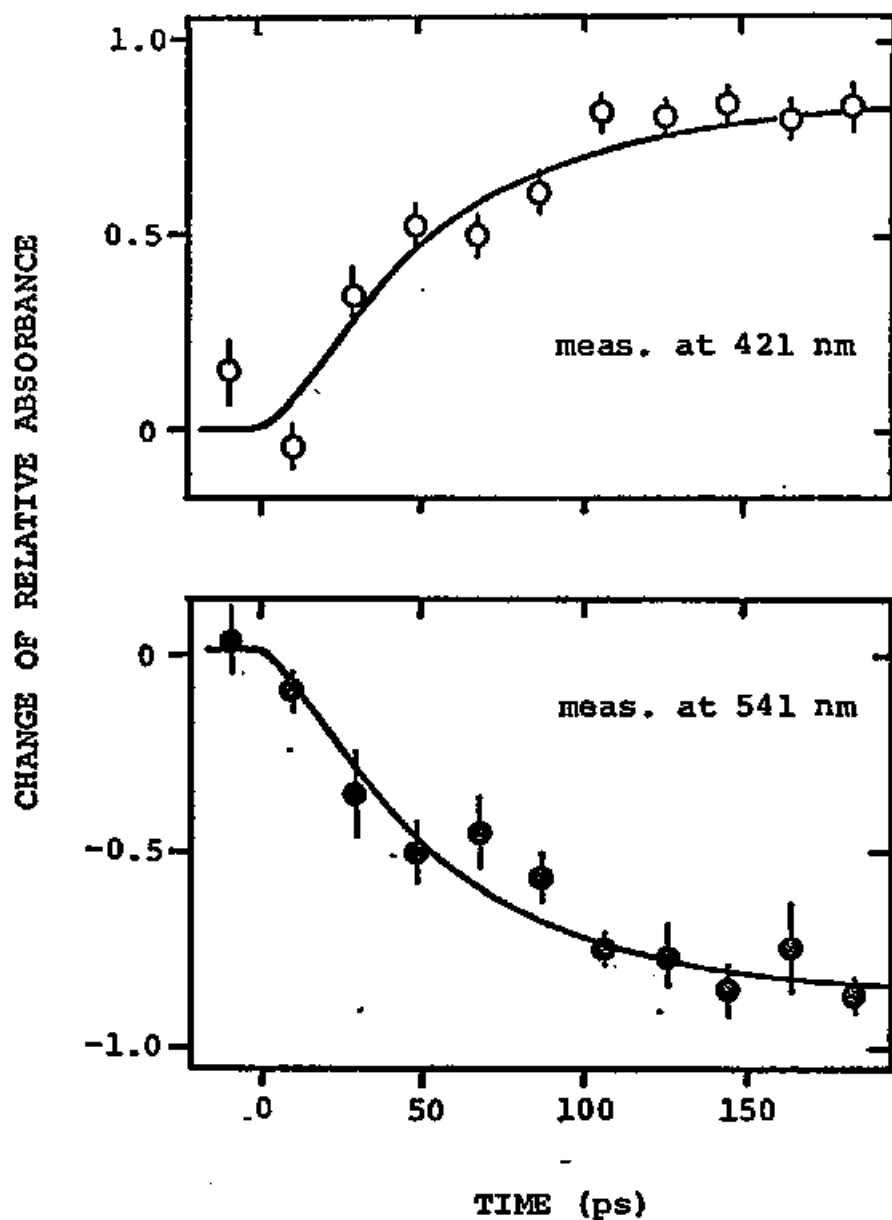


図 19, 液体窒素温度における C_{60} フルレネンの生成.

C_{60} フルレネン抽出液を液体窒素温度で 10 ns パルス (波長: 347 nm, パルス幅 20 ns) で励起した後の, 421 nm (上図) と 541 nm (下図) の吸光度変化を時間に対して図示した。

励起後、 421 nm の吸収度は徐々に増加し、
 541 nm の吸収度は徐々に減少する。これらの
 吸収度変化の時間数は、 70 ± 10 秒、 85 ± 20 秒（これらの3回の平均）で、実験
 誤差内で一致した。したがって、ロドプシン
 が、1つの産物へ変化していく過程が測定さ
 れたと考えられる。図のように、励起直後の
 421 nm と 541 nm の吸収度に大きな変化はな
 らない。これは、ロドプシンの励起状態
 の吸収スペクトルは、これらの波長に
 関するかわり、ロドプシンのものと大きく違
 っていることを示している。また、ロドプシ
 ンの励起状態から生成した産物は、ロドプ
 シンにくらべて、 421 nm の吸収度が大きく、
 541 nm では小さい。結局、図19の吸収度
 変化は、ロドプシンから励起状態と通
 って、ヒドロロドプシンの生成する過程
 が測定されたと考えられる。

図20に、光パルスの強度を変化させたとき
 のヒドロロドプシンの生成量を目もった。図の

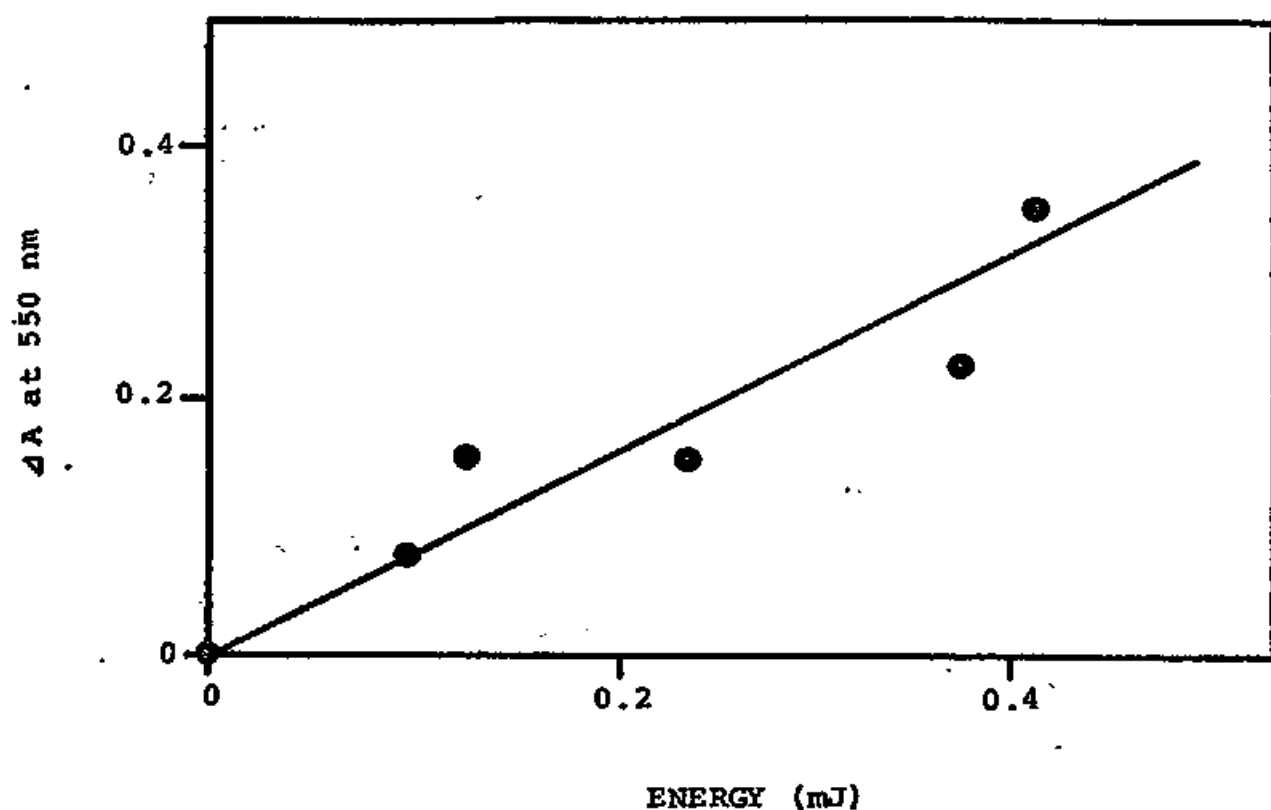


図 20, マルチ光子効果の検討.

ロブリン抽出液を励起する光パルスの強度を、
 ポリロブリンの生成と系中 550 nm の吸収の増加量に
 対して見た。直線関係が成り立っていることより、
 マルチ光子効果は起こっていることがわかる。

ように、直線関係がなり立つことより、マルチフォトン効果や光強度の飽和は起こっていないことがわかった。

3) 常態でロドプシンをナノ秒パルスで励起した後、スペクトル変化。

バソロドプシンからルミロドプシンへ変化する過程を測定するため、窒素レーザーから発生するナノ秒パルス（波長：337 nm，パルス幅，3.4 ナノ秒）を利用してロドプシンを励起し、その後、550 nm の吸光度の変化を測定した。ロドプシンの励起直後に、バソロドプシンの生成を示す吸光度増加が起こり、その後、図21のように吸光度が徐々に減少する過程が測定された。半減期プロットにより、この変化の時間定数は、300¹¹ ナノ秒と計算された。

4) イカロドプシンの光吸収後の反応過程^{24,25)}

以上の結果と、すでに報告した結果を合わせて、イカロドプシンの光吸収後の反応過程

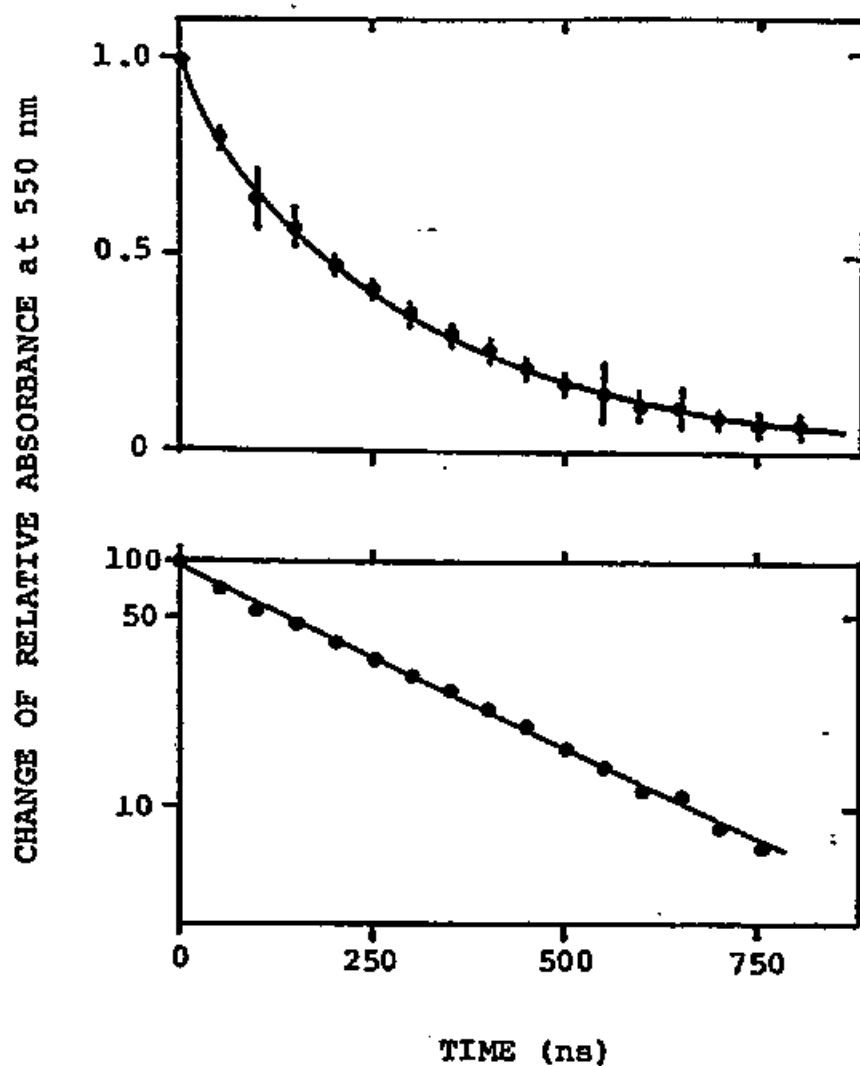


図 2/1, バッセルドフリンからルミロドフリンへの変化過程 (室温)

上図: ロドフリン相変遷液を、 24.5°C で ± 1 秒パルス

(波長: 337nm , パルス幅 3.4 ± 1 秒) で励起した

後の 550nm の吸光度の変化を時間に対して

見た。

下図: 上図の片対数プロット

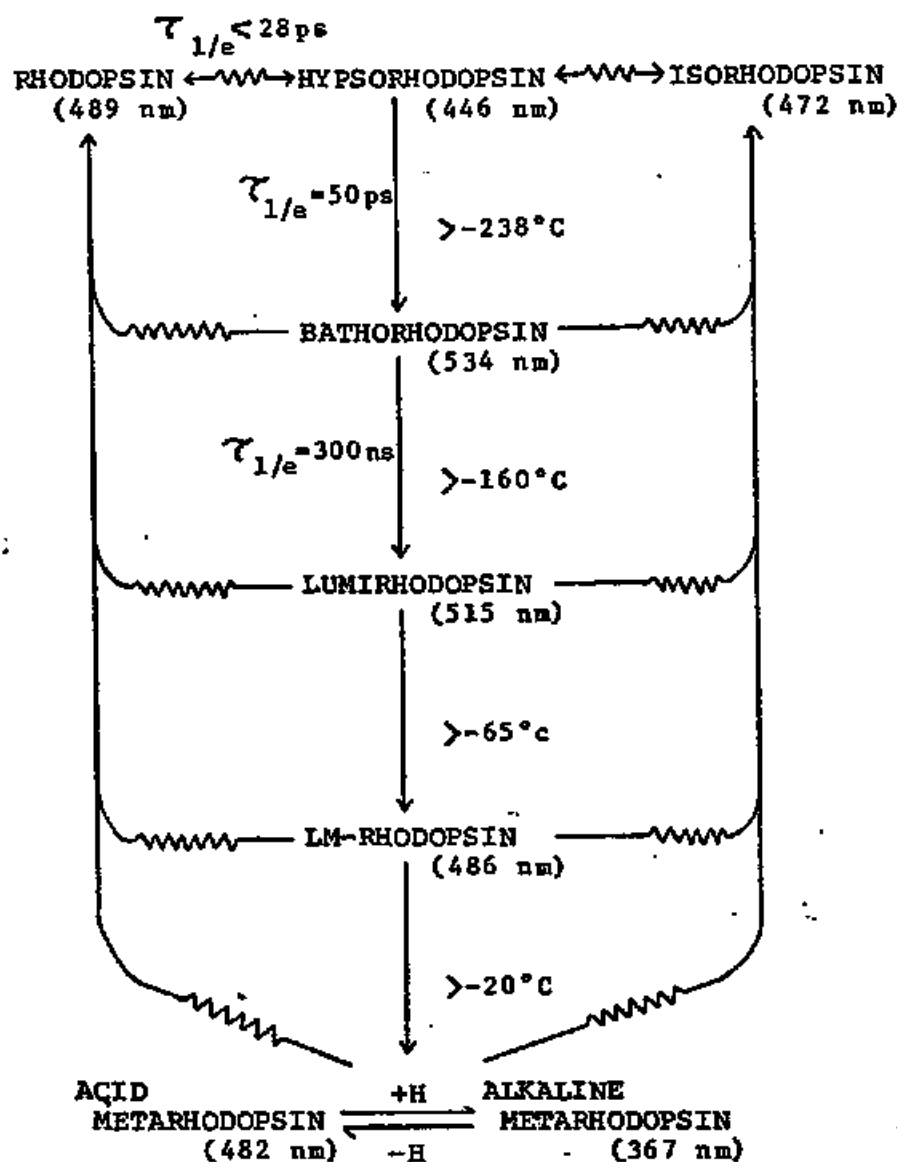


図 22 アカセドプシンの光吸収後の反応過程。

直線は熱反応、波線は光反応を表わす。

括弧内は光反応の中間体の λ_{max} を表わす。

直線の右側の数字は、その温度以上で矢印の

上の中間体が下の中間体に変化する温度である。

また左側の数字は矢印の下の中間体の室温での崩壊の時間数である。

を表現すると図 22 のようになる。ロドプシンは
光を吸収するとヒアソロドプシンに変化する。
ヒアソロドプシンは、その後、熱反応で、バ
ソロドプシン、ルミロドプシン、LM-ロドプ
シンと変化し、最終的にメタロドプシンに変
化していく。

IV 考 察

以上の結果から、液体ヘリウム温度で発見されたヒアソロドプシンが、常温でも生成すること、及び、ヒアソロドプシンは、バソロドプシンの前駆体であることなどが見いだされた。すなわち、ロドプシンの光分解産物はヒアソロドプシンである。

IV - 1 ヒアソロドプシンの発色団の構造

ヒアソロドプシンは、熱的（35 K 以上）にバソロドプシンに変化し、ヒアソロドプシンを 0°C で温めた試料からレチナール発色団を抽出すると、オールトランスレチナールが検出される（七田ら、未発表）。また、光でロドプシン（11-シス型）、アインソロドプシン（9-シス型）に変化する。さらに、ロドプシンからもアインソロドプシンからも、同じヒアソロドプシンが生じ、液体ヘリウム温度

で、未定常状態が成立する。これらのことから、ヒグソロドグシンの発色団レタナールの11-12の二重結合は、すでに、トランス型に異性化していると考えられる。

ヒグソロドグシンの発色団の構造を推定する場合、バリロドグシンと比較するのは有益である。ヒグソロドグシンは、55kでバリロドグシンへ変化するにもかかわらず、 λ_{max} が約90nm違っている。バリロドグシンは、いろいろな実験から、プロトン化したオニルトランス型のレタナールシッフ塩基を発色団として持つ²⁶⁾といわれている。両者の λ_{max} の違いを説明するために、ヒグソロドグシンの発色団の構造に、次の3つの可能性が考えられる。

1) 脱プロトン化した、レタナールシッフ塩基。

2) レタナールの7-8の二重結合(あるいは8-9の単結合)が90°近くねじれ、二重結合系に切断が起こった、プロトン

化したレタナールシッフ塩基。

3) レタナール発色団とまわりのタンパク質との間に特別な相互作用がない、プロトン化したレタナールシッフ塩基。

1) の可能性は、アルユール溶液中のレタナールシッフ塩基がプロトン化されたときの λ_{max} の長波長移動の度合 (380 nm から 440 nm へのエネルギー差) が、ヒドロロドポシンとバロロドポシンの λ_{max} の間のエネルギー差に近いか^{6.13)} ことから推定された。2) の可能性は、レトロイ-レタナールという、7-8 の二重結合が単結合になつたレタナールのラナログがあると、イオシソとから合成するラナログ色素の λ_{max} ²⁷⁾ が、425 nm 付近にあることから推定された。さらに、3) の可能性は、アルユール中で測定されたプロトン化したレタナールシッフ塩基の λ_{max} が、約 440 nm にある²⁸⁾ ことから推定され^{6.13)} た。

これらの3者の可能性のなかで、1) の可能性が一番高い。理由は以下の通りである。

また、ヒパソロドプロシノとバソロドプロシノの振動強度が同じであることがあげられる。一般に、共役オリエンの振動強度は、二重結合の数が増えるに従って大きくなる。もし、ヒパソロドプロシノの発色団の二重結合の数が4個(2)の可能性の場合)であれば、バソロドプロシノ(6個)に較べてかなり小さいはずである。

次に、遊離のプロトン化1,4-ナールシッフ塩基の、液体窒素温度での吸収スペクトルの半値幅は、HClでプロトン化させた場合、 6145 cm^{-1} (λ_{max} : 444 nm)²⁹⁾である。また、*Ommastrephes sloani pacificus*のロドプロシノを0.01 M TCAで処理した場合(変性オマシノとプロトン化シッフ塩基)、 5839 cm^{-1} (λ_{max} : 455 nm)²⁹⁾である。これは、ヒパソロドプロシノの半値幅(4500 cm^{-1})より約 $1,500\text{ cm}^{-1}$ も幅広い。これらの違いは測定温度が違う(液体窒素温度と液体ヘリウム温度)ことに起因している。実際、ロドプロシノやバソロドプロシノでは、液体窒素

温度と液体ハリウム温度との半値幅の差は約
 100 cm⁻¹ である。したがって、半値幅を考えると、
 ヒグソロドプロシンのプロトン化シッフ塩
 基では無いと考えられる。また、ヒグソロド
 プロシンの発色団の異性化の量と収率は、最低
 に見積り、とも、タンソロドプロシン ($\phi \approx 0.12$)
 より大きいので、アルキール中のプロトン化
 したオールトランスレクターシッフ塩基下
 りも大きい ($\phi < 0.06$ ³⁰⁾)。したがって、ヒグ
 ソロドプロシンの発色団を、タンパク質と相互
 作用の無いプロトン化したシッフ塩基と見な
 すことはできない。

以上のことから、ヒグソロドプロシンの発色
 団は、脱プロトン化した、11-12の二重結合
 がトランス型に存在したレクターシッフ塩基
 であると結論される。

IV - 2. 液体ヘリウム温度での、バソロドプシンの生成について。

液体ヘリウム温度でロドプシンを光照射すると、ヒパソロドプシンの他にバソロドプシンも生成する。ヒパソロドプシンの府底温度は35Kであり、液体ヘリウム温度(4K)よりかなり高い。したがって、液体ヘリウム温度で生成するバソロドプシンは、一度生成したヒパソロドプシンが、熱的に変化したものではなく、ロドプシン(あるいは、ヒパソロドプシン)の励起状態から緩和する過程で生成したものと考えられる。このバソロドプシンの生成のしかたについて、次の2つの可能性が考えられる(図23参照)。

1) ロドプシンの励起状態から、直接バソロドプシンが生成する。

2) ロドプシンの励起状態から(あるいは、生成したヒパソロドプシンが、光を吸収して励起状態に上がると)、ヒパソロドプシンの高い振動(あるいは、回転)

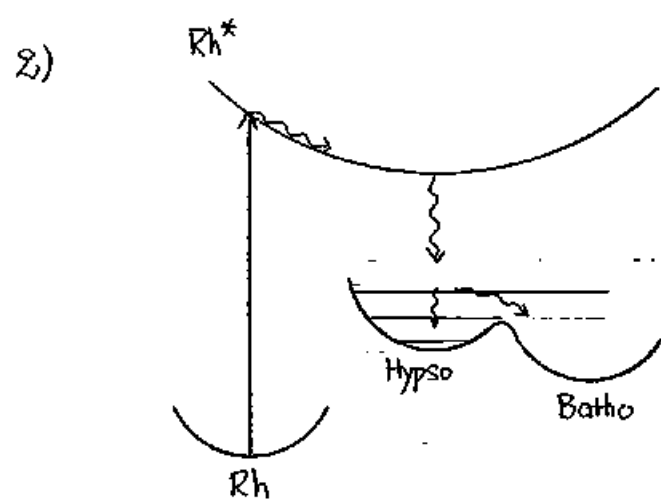
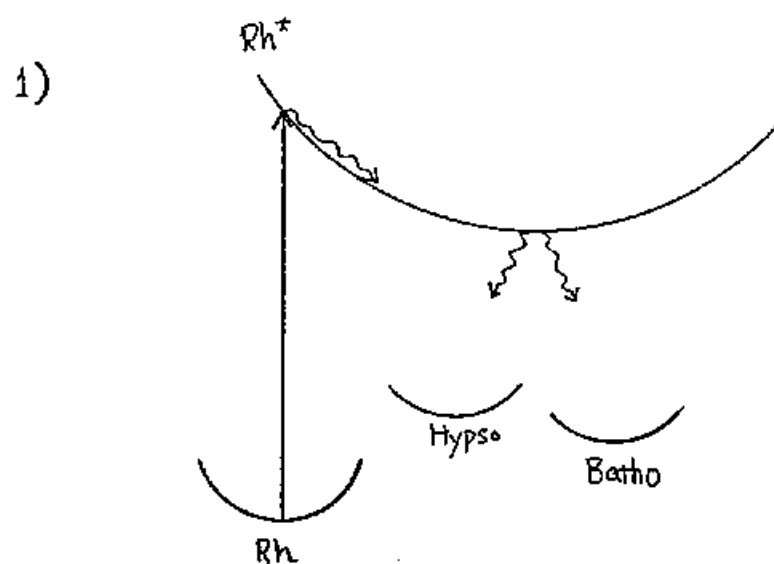


図 23, ロドフシン光吸収以後の反応経路 (液体ヘリウム温度)

レベルハと反応が進み、そのレベルから
 ロソロドプロシンの振動回転の基底状態
 とバソロドプロシンへの反応が進む。

両者の違いは、ロドプロシンの励起状態の断
 熱ポテンシャルの平衡点に於ける構造が、ロ
 ソロドプロシンとバソロドプロシンの於ける構造
 の中間の構造であるか(1)の場合)、ロソ
 ロドプロシンに近い(2)の場合)である。ロ
 ドプロシンの励起状態についての知見が乏しい
 現在、どちらが正しいかを決めるのはむづか
 しい。しかし、レーザーフォトリシスの結果
 は、常温、及び、液体窒素温度でロドプロシン
 が光を吸収すると、ロソロドプロシンのみに
 変化することを示している。したがって、も
 し(1)の可能性が正しいなら、液体窒素温度以
 上の温度と液体ヘリウム温度では、ロドプロシ
 ンの光反応の経路が異なることになる。予備的
 な実験から、ロドプロシンがバソロドプロシンへ
 変化する量子収率は、液体窒素温度と液体ヘ
 リウム温度で、ほとんど変化しない(ただし、

液体ヘリウム温度では、ヒッソロドフシンの生成・量子収率をヒッソロドフシンのものに加えた)。したがって、両温度でヒッソロドフシンの光反応の経過が違ふとは考えにくい。以上のことから、2)の可能性のほうが強いと思われる。

2)の可能性は、別の言葉で言えば、一種の“melting effect”¹⁵⁾と言うことが出来る。すなわち、ヒッソロドフシンの励起状態からヒッソロドフシンの基底状態へ反応が進むとき、そのエネルギー差が熱エネルギー（振動、回転エネルギー）として、発色団からまわりのタンパク質に伝わる。その結果、ヒッソロドフシンのタンパク質が構造変化をおこし、ヒッソロドフシンの生成しにくくなるのである。

極低温での振動（回転）レベルの重要性として、下記のようなことが考えられる。

常温では、ヒッソロドフシンの発色には熱振動としており、レチナール発色団やタンパク質部分の滑槽やグミノ酸残基はいろいろなモードの振動

回転レベルにある。したがって、レタナール発色団が吸収した光エネルギーは、無輻射緩和ですみやかにタンパク部分に移され、熱平衡が達せられる。この結果、バソロドプシンは、ヒポソ状態のボルツマン分布に下って決まる速度で生成すると考えられる。

これに対し、極低温では、レタナール発色団、及び、タンパク分子の振動回転レベルは、完全に最低状態にあると考えられる。したがって、レタナール発色団に吸収された光エネルギーが分子内りりすミノ酸残基などに移動する際、少数の振動回転モードにのみ移されることになる。これらのモードの1つが、ヒポソロドプシンからバソロドプシンへのタンパク分子の構造変化を誘起するのであろう。

以下の議論のために、常温での活性化自由エネルギーを、絶対反応速度論に基づいて計算する。速度定数 k_r は、

$$k_r = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^*/RT}$$

k_B : ホルツマン定数

T : 絶対温度

h : プランク定数

R : ガス定数

ΔG^\ddagger : 活性化自由エネルギー

$k_r = 1/\tau_{1/2} \approx 2 \times 10^{10} / \text{sec}$ を代入すると, $\Delta G^\ddagger = 1160 \text{ cm}^{-1}$ となる。

IV - 3, ウシロドプシンとイカロドプシンの初期反応の速度の違い。

表 3 に, 現在までに報告されている 3 種のロドプシンの, 常温でのレーザ-フォトリシスの結果がまとめられている。ここでは, 主に, ウシロドプシンとイカロドプシンの実験結果の違いについて検討する。

表 3 のように, ウシロドプシンは, 常温で検出されおらず, バソロドプシンの生成は $10, 12)$ 10 ピコ秒以内, 崩壊は 30 ナノ秒 (40 ナノ秒) である。イカロドプシンの場合, 常温でバソロドプシンの生成が見られ (19 ピコ秒以内), バソロドプシンの生成時定数は 50 ピコ秒, 崩壊時定数は 300 ナノ秒である。両者のバソロドプシンに関する時定数は, 1 オーダ程違っている。この違いの説明について, 次の 3 つの可能性が考えられる。

1) ロドプシンを励起した波長の違い (ウシ;
 530 nm ¹⁰⁾, イカ; 347 nm)。

2) ロドプシンを抽出した界面活性剤の違い

表 3, 種々のロドプシンの中間体の生成崩壊速度の
比較

	^{10,12)} Cattle	Squid	¹¹⁾ Frog
Hypso formation	---	19 ps	---
Batho formation	6 ps	50 ps	---
decay	30 ns (40 ns)	300 ns	245 ns
Exciting pulse (wavelength)	530 nm (337 nm)	347 nm	540 nm
Physical state of rhodopsin	in 2% LDAO (in 2% Triton X-100)	in 2% dig.	in retina

(ウシ; DDL⁽¹⁰⁾, Triton X-100⁽¹²⁾, イカ; digitonin).

3) 動物の種類の違い。

まず、バソロドプシンの生成について検討する。ウシ、イカのヒパソロドプシンは、どちらも極低温(23 K, あるいは、35 K)でバソロドプシンに変化するもので、タンパク部分の骨格構造の変化はほとんどないと考えられる。抽出に用いた界面活性剤の違いで生成量の違いが起こるとは考えにくい。また、励起波長の違いについて述べると、レタナール含有の場合、オミ励起状態(吸収スペクトルの β -ピークに対応する)と最低励起状態(吸収スペクトルの α -ピークに対応する)との間のエネルギー差は、最低励起状態と基底状態との間のエネルギー差の約1/2であるから、オミ励起状態から最低励起状態へ落ちる速さは、最低励起状態から基底状態へ落ちる速さより大きいと考えられる。したがって、この違いを考慮する必要性は少ない。以上よりことから、バソロドプシンの生成の時定数の違いは、

両者のイグシン構造の違い, すなわち, 3) の可能性が大い。実際, エグソロドプシンからバソロドプシンへの変化温度は, ウシで 23 K, ヒカで 35 K であるから, それぞれの温度での反応速度が同じと仮定して, 両者の活性化自由エネルギーの比を計算すると,

$$\frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}_{\text{ウシ}}/RT} = \frac{k_B T'}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}_{\text{ヒカ}}/RT'}$$

$$T = 23 \text{ K}, \quad T' = 35 \text{ K}$$

$$\therefore -\Delta G^{\ddagger}_{\text{ウシ}} = RT \ln \frac{T'}{T} - \frac{T}{T'} \Delta G^{\ddagger}_{\text{ヒカ}}$$

となる。両者の ΔG^{\ddagger} の比が常温でも成り立つと仮定すると, $\Delta G^{\ddagger}_{\text{ヒカ}} = 1160 \text{ cm}^{-1}$ (p 84) であるから, $\Delta G^{\ddagger}_{\text{ウシ}} = 756 \text{ cm}^{-1}$ となる。これより, 常温でのウシのバソロドプシンの生成の時間定数は 6.9 ピコ秒と求められ, 実際の実験結果をかなり説明することができる。

一方, バソロドプシンの崩壊の時間定数は, タンパク部分の構造変化が無視できないので,

抽出に用いた界面活性剤の種類に、この影響をいえると考えられる。ジギトニンは、DDLO
 や Triton X-100 にくらべてマイルドな界面活性剤である。例えば、ジギトニンで抽出したオ
 プシノは、³¹⁾11-シスレタールと結合してロ
 ドプ³¹⁾シンに再生するが、DDLO や Triton X-100
 で抽出したオプシノでは、再生は起こらない。
 また、ジギトニンで抽出したロドプ³²⁾シンのCD
 が、視細胞外節を超音波破砕して測定したCD
 に一番近い。したがって、DDLO や Triton X-100
 で抽出したロドプ³²⁾シンから生成したバソロド
 プシンの崩壊時定数は、界面活性剤の影響で
 短くなく、このことが予想される。実際、カ
 エルの網膜中で測定したバソロドプ³³⁾シンの崩
 壊時定数は 246 ± 43 ナノ秒で、イカロドプシ
 ンで求められたものに近い。

IV-4, ロドプシンの光吸収後の構造変化についで

以上の結果と考察に基づいて、ロドプシンから、ヒプソロドプシンを通り、バソロドプシンまでの構造変化のモデルを考える。

ロドプシンの発色団は、プロトン化した、11-シスレタチールシッフ塩基であり、ヒプソロドプシンは、脱プロトン化した、11-トランスレタチールシッフ塩基、バソロドプシンは、プロトン化した、11-トランスレタチールシッフ塩基である。反転は、ロドプシン→ヒプソロドプシン→バソロドプシンへと進む。

ロドプシンからヒプソロドプシンへは、発色団が光エネルギーを吸収し、11-シス型から11-トランス型への異性化が起こり、それと同時に、シッフ塩基の脱プロトン化が起こる。その後、タンパク質の微小な変化が起こり、シッフ塩基が再プロトン化され、バソロドプシンが生成する。

よて、ヒプロロドプロシノカバソロドプロシ
ンハの変化の際の微少なタノパフ質構造の変化
も考察した。

常温でのピコ秒レーザーフォトリシスのデ
ータから求めた ΔG^\ddagger は 1160 cm^{-1} である。ヒプロ
ロドプロシンからバソロドプロシンへの反応で
の遷移状態を考えると、シッフ塩基がプロト
ンを受け取るために、プロトンの供与残基
とシッフ塩基との間に立体的な配向がなければ
いけない。つまり、遷移状態のエントロピー
は、ヒプロロドプロシンの状態より小さいと考
えられる。したがって、活性化エントロピー
(ΔH^\ddagger) は ΔG^\ddagger よりもさらに小さいと考えられ
る。また、ウシロドプロシンとヒカロドプロシンの
末端残基の反応が同じであるなら、ヒプロ
ロドプロシンからバソロドプロシンへの反応は、
数百 cm^{-1} のポテンシャルバリアーを越す反応
であると考えられる。

この小さいエネルギーは、分子の振動エネ
ルギーを考慮するには、十分に小さい。し

したがって、レチナール発色団のまわりのアミノ酸残基の一部が、ペプチド鎖や他の残基による束縛ポテンシャルをふりこ、一回転するエネルギーに相当すると考えられる。レチナール発色団にプロトンを提供できるアミノ酸残基は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジンなどである。オプシノは、pH 5.5 から pH 7.0 の間でレチナールと結合してロドプシンに再生するから、この間でプロトン化している残基として、ヒスチジンを考えるのが妥当である。したがって、ヒスチジンからロドプシンへの変化は、ヒスチジン残基の回転を契機に、レチナールシッフ塩基上にプロトンが移動することになり、引き起こされると考えられる。

ロドプシンの¹¹発色団はプロトン化しているが、このプロトンは、ロドプシンが生成するとき、近傍のアミノ酸残基から提供されたものである。上記と同様の考え方で、プロトンを提供できるアミノ酸残基はヒスチジンである

うと考えられよう。

ロドプシンにプロトンを取り戻す色素残基と、バソロドプシンにプロトンを取り戻すもののほ、同じ残基なのだろうか。

カエルの網膜を用いて、ロドプシンからバソロドプシンの変化で、遷移双極子モーメントの方向は、空間的に約 26° 変化すること³⁴⁾が報告されている。最近、ヒソロドプシンとバソロドプシンの遷移双極子モーメントの方向は同じであることが確かめられている³⁵⁾。したがって、ロドプシンからヒソロドプシンへの変化で、 β -イソニン節が動かないとすると、シッフ塩基のN原子は約 5\AA 移動する。この結果は、プロトンを取り戻す色素残基は違うことを示唆している。

結局、ロドプシンの光吸収後の反応メカニズムは、図24の通りにまとめることができる。

ロドプシンに光が当たるとレタナール発色団が励起される。励起状態で、11-12の二重結合が異性化と、シッフ塩基のN原子上のプロ

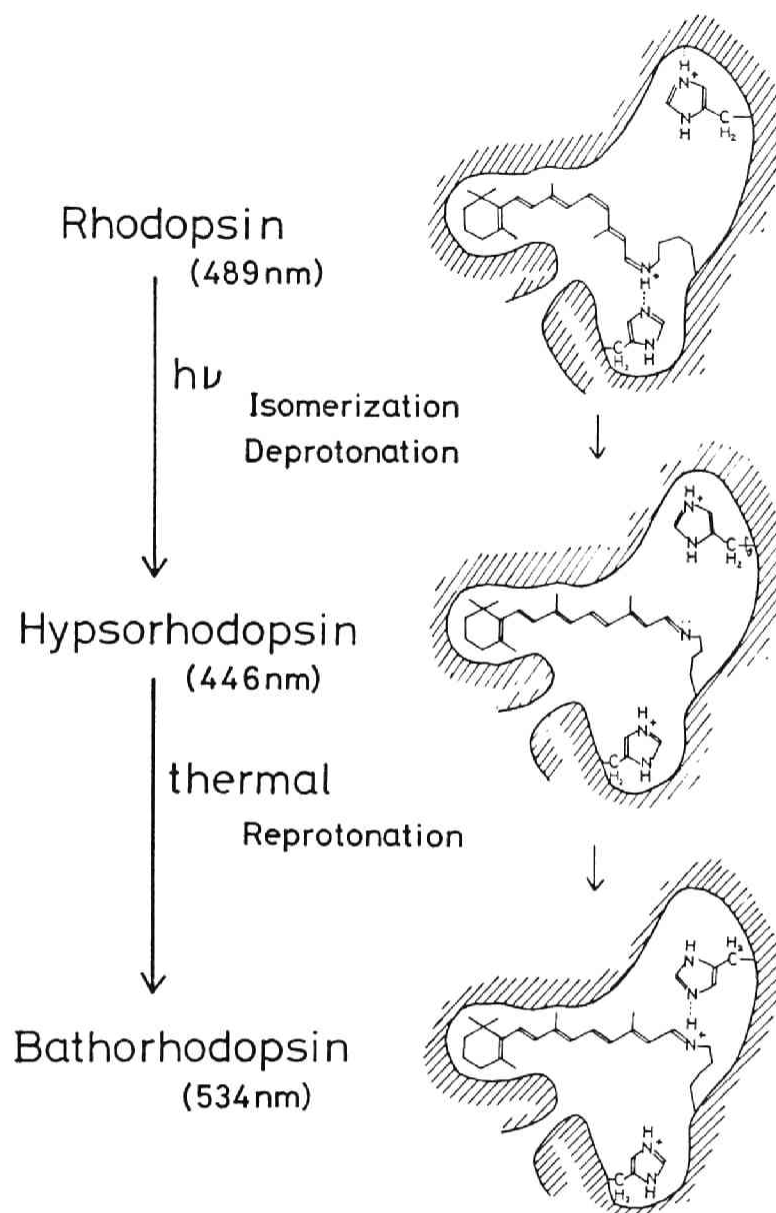


図 23, ロドプシンの光化学反応初期過程
(本文参照)

ロトノガヒスチジン残基に移動する。このレチナール発色団の異性化に伴って、まわりのタンパク構造が変化し、発色団近傍にあったもう一つのヒスチジン残基が、他との水素結合が切れて、非常に回転しやうい状態になる。これがヒップリ状態であろう。

その後、ヒスチジン残基の回転が起こり、レチナール発色団のシッフ塩基上のプロトン移動が起こり、これにより、新しい擬平衡状態であるバソドプロシンが生成するのである。

以上のように、先に述べたバソドプロシンに誘起される反応は、レチナール発色団のシストランス異性化と、シッフ塩基のN原子上にあったプロトンのミミ酸残基への移動であると推察される。これらの反応によって、バソドプロシン分子内にひずみが生じると同時に、タンパク分子中に電荷の分離が生じ、分子の大きな構造変化が引き起こされると考えられる。そして、この分子の構造変化が、膜電位

の発生に関係する、膜のイオン透過性の変化
を引き起こすのであらう。

要 約

先に述べた誘起されるロドプシンの構造変化を調べる目的で、

- 1) ロドプシンの液体ヘリウム温度での光反応を低温吸収スペクトル法で、
 - 2) 常温と液体窒素温度での光反応をピコ秒、及び、ナノ秒レーザーストリス法で
- 所収した。

その結果、

- 1) 液体ヘリウム温度でロドプシン ($\lambda_{max}; 489 \text{ nm}$)、及び、アイソロドプシン ($\lambda_{max}; 472 \text{ nm}$) を光照射すると、ヒポソロドプシン ($\lambda_{max}; 446 \text{ nm}$) とバソロドプシン ($\lambda_{max}; 534 \text{ nm}$) の2つの中間体が生成した。
- 2) ヒポソロドプシンとバソロドプシン共に、光を吸収すると、ロドプシンとアイソロドプシンに変化した。
- 3) ヒポソロドプシンは、35 K以上の温度に温

められるとバソロドフシンに変化した。

- 4) ヒプロソロドフシン, バソロドフシンは、網膜の膜画であるマインウロビライ中のロドフシンを光照射したときも生成した。
- 5) 常温でロドフシンを10秒パルスで励起すると、19秒以内、ヒプロソロドフシンの生成を示す、430nmの吸収度の増加がみられ、その後、約50秒の時間数で、バソロドフシンの生成を示す、550nmの吸収度の増加と、430nmの吸収度の減少が観測された。これらより、ロドフシンのオキ先産物はヒプロソロドフシンで、これはバソロドフシンの前駆体であると結論された。
- 6) 液体ヘリウム温度でロドフシンを10秒パルスで励起すると、約70秒の時間数でヒプロソロドフシンの生成を示す、421nmの吸収度の増加と、541nmの吸収度の減少が観測された。
- 7) 上記の結果から、ロドフシンからヒプロソロドフシンへの過程で、発色団である、プロ

トシ化レタイールシッフ塩基の、シーストランス異性化と、プロトンのオキシンのへの移動が起こってゐると推察された。また、ヒドロドロフィンからバソドロフィンへの過程は、発色団レタイールシッフ塩基の再プロトン化によつて誘起されたと推察された。

- 8) 常温でドロフィンをナノ秒パルスで励起することにより、バソドロフィンは、300 ナノ秒の時間数でルミドロフィンへ変化する事がわかった。

謝 辞

本研究室、あらゆる機会をとらえて、絶えず、指導、激励していただいた、吉澤透教授に感謝します。また、共同研究者として実験を担当してくださった、前田章次郎教授、徳永史生助手、理化学研究所主任研究員、長倉三郎教授、理化学研究所研究員、小林孝嘉、大谷弘之の各位に感謝いたします。また研究室のいろいろな方お世話になった、吉澤研究所長の皆様に感謝いたします。

Ⅶ 文 献

- 1) Wald, G., Brown, P. K. : Science 127, 222 (1958)
- 2) 原 富久, 吉澤 透: "光感覚の分子生理" 共立出版 (1973)
- 3) Sjöstrand, F. S. : Rev. Mod. Phys 31, 301 (1959)
- 4) 田崎 京二 : "生体の科学" 18, 166 (1967)
- 5) Brown, K. T., Watanabe, K. : Nature 193, 958 (1962)
- 6) Yoshizawa, T. : "Handbook of Sensory Physiology VII/1" ed. by Dantnall, H. J. A., Springer Verlag, Heidelberg (1972)
pp 146-179
- 7) Yoshizawa, T., Kito, Y. : Ann. Rev. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ. 6, 27 (1958)
- 8) 文献 6) に その結果が 示されている。
- 9) Tokunaga, F., Kawamura, S., Yoshizawa, T. : Vision Res. 16, 633 (1976)
- 10) Busch, G. E., Applebury, M. L., Lamola, A. A., Renzepis, P. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 2802 (1972)
- 11) Cone, R. A. : Nature New Biol. 236, 39 (1972)
- 12) Rosenfeld, T., Alchalel, A., Ottolenghi, M. : Nature 240,

482 (1972)

- 13) Yoshizawa, T., Horiuchi, S : "Biochemistry and Physiology of Visual Pigments" ed. by Langer, H. Springer-Verlag Heidelberg (1973) pp 69-81
- 14) Wald, G. : Exp. Eye Res. 18, 333 (1973)
- 15) Yoshizawa, T. Wald, G. : Nature 197, 1279 (1963)
- 16) Peters, K. Applebury, M.L., Rentzepis, P.M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3119 (1977)
- 17) Hara, T., Hara, R. : Proc. ISCERG Symp. Jap. Ophthalm. 10 Suppl. 22 (1966)
- 18) Hubbard, R., St. George, R.C.C. : J. Gen. Physiol. 41, 501 (1958)
- 19) Yoshizawa, T. Wald, G. : Nature 201, 340 (1964)
- 20) Kobayashi, T. Nagakura, S. : Chem. Phys. Lett. 43, 429 (1976)
- 21) Rowan III, R., Warshel, A., Sykes, B.D., Karplus, M. : Biochemistry 13, 970 (1974).
- 22) Simmons, H.E. : Progr. Phys. Org. Chem. 7, 1 (1970)
- 23) ウヰ 文献 6). 13)
- 721 Horiuchi, S., Yoshizawa, T. : Zool. Magazine 83, 300 (1974)
- 724 Tsukamoto, Y., Horiuchi, S. Yoshizawa, T. : Vision Res. 15, 819 (1975)
- 24) Tokunaga, F., Shichida, Y., Yoshizawa, T. : FEBS Lett. 55,

229 (1975)

25) Shichida, Y., Tokunaga, F., Yoshizawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*
504, 413 (1978)

26) 例えは、吉澤 透, 七田芳則: *化学の領域*, 32, 159 (1978).
にまとめられている。

27) Ito, M., Hirata, K., Kodama, A., Tsukida, K., Matsumoto, H.,
Horiuchi, K., Yoshizawa, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 26(3), 925 (1978)

28) Pitt, G. A. J., Collins, F. D., Morton, R. A., Stok, P.: *Biochem. J.* 59
122 (1955)

29) Suzuki, T., Kito, Y.: *Photochem. Photobiol.* 15, 275 (1972) の
図 1. 4. から計算した。

30) Alchalel, A., Honig, B., Ottolenghi, M., Rosenfeld, T.: *J. Am.*
Chem. Soc. 97, 2161 (1975)

31) Wald, G., Brown, P. K.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 36, 84 (1950)

32) Shichi, H.: *Photochem. Photobiol.* 13, 499 (1971)

33) Radding, C. M., Wald, G.: *J. Gen. Physiol.* 39, 923 (1956)

34) 河村 権: 京都大学博士論文 (1978)

35) Sasaki, N., Tokunaga, F., Yoshizawa, T.: in preparation.